

# DESIGN STABILER UND KATALYTISCH AKTIVER ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>-*BARREL* ENZYME DURCH REKOMBINATION VON ( $\beta\alpha$ )<sub>4</sub>-HALBBARREL DOMÄNEN

---

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER  
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER  
NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III – BIOLOGIE UND VORKLINISCHE  
MEDIZIN DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



vorgelegt von  
Jörg Claren aus Bedburg

**Juni 2008**

Promotionsgesuch eingereicht am: 25. Juni 2008

Kolloquium am: 28. Oktober 2008

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Reinhard Sterner

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Reinhard Wirth

1. Prüfer: Prof. Dr. Reinhard Sterner

2. Prüfer: Prof. Dr. Gernot Längst

3. Prüfer: Prof. Dr. Michael Thomm

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2004 bis Juni 2008 am Lehrstuhl Biochemie II des Institutes für Biophysik und physikalische Biochemie der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität zu Regensburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Reinhard Sterner angefertigt.

*für meine Eltern*



# Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	VII
TABELLENVERZEICHNIS .....	X
FORMELVERZEICHNIS .....	XII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	XIII
ZUSAMMENFASSUNG .....	1
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>4</b>
1.1 Mechanismen molekularer Evolution .....	4
1.2 Die $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Struktur .....	6
1.3 Vergleich von $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzymen der Histidin- und Tryptophanbiosynthese .....	8
1.4 Die Evolution der $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Struktur aus $(\beta\alpha)_4$ -Halbbarreln .....	11
1.5 Konstruktion chimärer Proteine aus HisA und HisF .....	15
1.6 Rationales Design versus gerichtete Evolution .....	16
1.7 Zielsetzung der Arbeit .....	17
<b>2 MATERIAL .....</b>	<b>18</b>
2.1 Bakterien- und Hefestämme .....	18
2.2 Vektoren .....	22
2.2.1 pET-Vektoren .....	22
2.2.2 pER-Vektoren .....	23
2.2.3 pMal-c2 .....	25
2.2.4 pQE-Vektoren .....	25
2.2.5 pDML1 .....	26
2.2.6 pCFN1 .....	26
2.2.7 pTNA .....	27
2.2.8 pHCE-IIB .....	27
2.2.9 <i>E. coli</i> -Hefe-Shuttle-Vektoren .....	28
2.2.9.1 pGAD424 .....	28
2.2.9.2 pAS2-1 .....	28
2.3 Oligodesoxyribonukleotide .....	29
2.3.1 Vektorspezifische Amplifikations- und Sequenzierungsprimer .....	29
2.3.1.1 Sonstige Amplifikationsprimer .....	30
2.3.2 Amplifikations- und Mutagenisierungsprimer für <i>hisA</i> .....	31
2.3.3 Amplifikations- und Mutagenisierungsprimer für <i>hisF</i> .....	32
2.3.4 Primer zur Herstellung der <i>E. coli</i> Deletionsstämme $\Delta hisA$ , $\Delta hisF$ und $\Delta hisA\Delta hisF$ .....	34

2.3.5 Primer zur Herstellung von HisAF-Interaktionsvarianten mit HisH .....	35
<b>2.4 Längenstandards .....</b>	<b>36</b>
<b>2.5 Enzyme .....</b>	<b>36</b>
<b>2.6 Chemikalien .....</b>	<b>36</b>
<b>2.7 Kits .....</b>	<b>37</b>
<b>2.8 Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>37</b>
<b>2.9 Geräte .....</b>	<b>38</b>
<b>2.10 Nährmedien für <i>E. coli</i> .....</b>	<b>41</b>
<b>2.11 Nährmedien für <i>S. cerevisiae</i> .....</b>	<b>42</b>
<b>2.12 Puffer und Lösungen .....</b>	<b>42</b>
2.12.1 Arbeiten mit <i>E. coli</i> .....	42
2.12.2 Arbeiten mit <i>S. cerevisiae</i> .....	44
2.12.3 Arbeiten mit DNA .....	44
2.12.4 Agarosegelelektrophorese .....	44
2.12.5 Arbeiten mit Proteinen .....	45
2.12.6 SDS-Polyacrylamidelektrophorese .....	46
<b>2.13 Software .....</b>	<b>47</b>
<b>3 METHODEN .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1 Vorbereitung von Geräten und Lösungen .....</b>	<b>48</b>
<b>3.2 Mikrobiologische Methoden .....</b>	<b>48</b>
3.2.1 Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i> Stämmen .....	48
3.2.2 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen zur chemischen Transformation (Inoue <i>et al.</i> , 1990) .....	49
3.2.3 Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> Zellen .....	49
3.2.4 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen zur Elektrottransformation (Dower <i>et al.</i> , 1988) .....	49
3.2.5 Vorbereitung von DNA für die Elektroporation .....	50
3.2.6 Transformation von elektrokompenten <i>E. coli</i> Zellen .....	50
3.2.7 Bestimmung der Transformationseffizienz .....	51
3.2.8 <i>In vivo</i> Komplementationstest .....	51
3.2.9 <i>In vivo</i> Tests auf Löslichkeit von Proteinen .....	52
3.2.9.1 <i>In vivo</i> Test auf Löslichkeit eines Proteins mit Hilfe der Chloramphenicolacetyltransferase als Reporter .....	52
3.2.9.2 <i>In vivo</i> Test auf Löslichkeit eines Proteins mit Hilfe des „Grün Fluoreszierenden Proteins“ als Reporter .....	53
3.2.10 Durchflusszytometrie von <i>E. coli</i> Zellen .....	54
3.2.11 Herstellung kompetenter <i>S. cerevisiae</i> Zellen .....	55
3.2.12 Li-Ac-Transfektion von <i>S. cerevisiae</i> Zellen und Überprüfung mittels Auxotrophie-Marker .....	56
3.2.13 Qualitativer Interaktions-Assay mittels Interaktions-Marker ( <i>yeast-2-hybrid</i> ) .....	56
<b>3.3 Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>58</b>
3.3.1 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	58

3.3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA in analytischen Mengen (Mini-Präparation) .....	58
3.3.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA in präparativen Mengen (Midi/Maxi-Präparation) .....	58
3.3.2 Bestimmung der DNA-Konzentration .....	59
3.3.3 Agarosegelelektrophorese .....	59
3.3.3.1 Isolierung von DNA-Fragmenten .....	60
3.3.4 Enzymatische Manipulation von dsDNA .....	60
3.3.4.1 Spaltung von dsDNA mit Restriktionsendonukleasen .....	60
3.3.4.2 Ligation von DNA-Fragmenten .....	61
3.3.5 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Standard- und <i>touchdown</i> -PCR .....	61
3.3.6 Kolonie-PCR .....	63
3.3.7 PCR-Methoden zur gerichteten und zufälligen Mutagenese .....	64
3.3.7.1 Megaprimer-PCR (Sarkar & Sommer, 1990) .....	64
3.3.7.2 <i>Overlap Extension</i> -PCR (Ho <i>et al.</i> , 1989) .....	64
3.3.7.3 QuickChange-PCR .....	65
3.3.7.4 Zufallsmutagenese durch <i>error-prone</i> PCR .....	67
3.3.8 Herstellung von Genbanken .....	68
3.3.8.1 Bestimmung der Größe einer Genbank .....	69
3.3.9 DNA-Sequenzierung .....	69
<b>3.4 Proteinchemische Methoden .....</b>	<b>70</b>
3.4.1 Genexpression und Proteianreicherung .....	70
3.4.1.1 Expression und Anreicherung von Proteinen im analytischen Maßstab .....	70
3.4.1.2 Expression und Anreicherung von Proteinen im präparativen Maßstab .....	71
3.4.1.3 Proteinpräparation aus der unlöslichen Zellfraktion .....	71
3.4.2 Proteinreinigung aus der löslichen Zellfraktion .....	72
3.4.2.1 Hitzeschritt .....	72
3.4.2.2 Metallchelate-Affinitätschromatografie .....	72
3.4.2.3 Affinitätschromatografie mittels Blue Sepharose .....	74
3.4.2.4 Ionenaustauschchromatografie .....	74
3.4.2.5 Dialyse von Proteinlösungen .....	76
3.4.2.6 Einkonzentrieren von Proteinlösungen .....	76
3.4.2.7 Lagerung von gereinigtem Protein .....	76
<b>3.5 Analytische Methoden .....</b>	<b>77</b>
3.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration durch Absorptions-spektroskopie .....	77
3.5.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	78
3.5.2.1 Vorbereitung der N-terminalen Sequenzierung .....	79
3.5.2.2 Analyse der Proteinlöslichkeit mittels SDS-PAGE .....	80
3.5.3 Analytische Gelfiltration .....	80
3.5.4 Fluoreszenz-Spektroskopie .....	81
3.5.5 Bestimmung der Proteinstabilität mittels chemischer Denaturierung .....	81
3.5.6 <i>Steady-state</i> Enzymkinetik .....	84
3.5.6.1 Kinetik von HisA und HisF .....	84
3.5.6.2 Kinetik von TrpF .....	85
3.5.7 Ligandenbindung .....	86

3.5.7.1 Bindung von ProFAR an TrpF-aktive HisA- und HisAF-Varianten .....	86
3.5.7.2 Bindung von rCdRP .....	87
<b>4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>88</b>
<b>4.1 Herstellung von chimären Proteinen aus den <math>(\beta\alpha)_8</math>-Barrel Enzymen HisA und HisF .....</b>	<b>88</b>
<b>4.2 Stabilisierung von HisAF durch rationales Design .....</b>	<b>90</b>
4.2.1 Stabilisierung von HisAF durch Rekonstruktion eines Salzbrückenclusters .....	96
4.2.2 HisAF-Y140H+V231M .....	99
<b>4.3 Stabilisierung von HisAF durch gerichtete Evolution .....</b>	<b>101</b>
4.3.1 Selektion auf stabilisierte HisAF-Varianten durch Fusion an die CAT .....	101
4.3.2 <i>Screening</i> nach einer stabilisierten HisAF-Variante durch Fusion an GFP .....	104
4.3.2.1 Herstellung und Charakterisierung einer <i>hisAF</i> -Genbank und anschließendes <i>in vivo</i> <i>Screening</i> durch FACS-Analyse .....	108
4.3.2.2 Herstellung und Charakterisierung einer <i>hisA<sub>rand</sub>F</i> -Genbank und anschließendes <i>in vivo</i> <i>Screening</i> durch FACS-Analyse .....	113
4.3.2.2.1 Charakterisierung der HisA <sub>rand</sub> F-Varianten auf Löslichkeit und Stabilität .....	120
4.3.2.2.2 Gezielte Kombination von Austauschen zur Verbesserung der Löslichkeit von HisAF ....	124
<b>4.4 Gezielte Kombination von Austauschen aus rationalem Design und gerichteter Evolution, welche die Löslichkeit und Stabilität von HisAF erhöhen .....</b>	<b>127</b>
<b>4.5 Screening nach einer stabilisierten HisFA-Variante durch Fusion an GFP .....</b>	<b>129</b>
<b>4.6 Etablierung von TrpF-Aktivität auf der Chimäre HisAF .....</b>	<b>132</b>
4.6.1 Erstellung einer Genbank auf <i>hisAF</i> .....	132
4.6.2 Komplementation von $\Delta trpF$ -Zellen mit der pTNA- <i>malE-hisAF</i> Genbank .....	135
4.6.2.1 Ergebnis der Selektion auf M9 <sub>Amp</sub> <sup>-</sup> -Selektionsplatten und im M9 <sub>Amp</sub> <sup>-</sup> -Flüssigselektionsmedium .....	135
4.6.2.2 Retransformation der $\Delta trpF$ -Zellen mit den selektierten HisAF-Varianten .....	139
4.6.3 Expression und Reinigung der selektierten HisAF-Varianten mit TrpF-Aktivität .....	140
4.6.4 <i>In vitro</i> Charakterisierung der selektierten HisAF-Varianten mit TrpF-Aktivität .....	143
4.6.4.1 <i>Steady-state</i> enzymkinetische Messungen der TrpF-Aktivität der gereinigten HisAF-Varianten .....	143
4.6.5 Charakterisierung von HisAF-Varianten nach gezielter Mutagenese .....	145
4.6.5.1 HisAF-Y140H+D127V und HisAF-Y140H+D8N+D127V .....	145
4.6.6 Gezielte Kombination von gefundenen Austauschen .....	148
4.6.6.1 HisAF <sub>comI</sub> (HisAF-Y140H+D127V+D173V) .....	148
4.6.6.2 HisAF <sub>comII</sub> (Y140H+H75Y+F111L+D127V+D173V) .....	150
4.6.6.3 HisAF <sub>comIII</sub> (Y140H+H75Y+F111L+D127V+K143E+T146M+D173V) .....	152
4.6.6.4 Ligandenbindung an HisAF <sub>comII</sub> und HisAF <sub>comIII</sub> .....	154
4.6.6.4.1 Bindung von rCdRP an HisAF <sub>comIII</sub> .....	154
4.6.6.4.2 Kompetitive Inhibition der TrpF-Reaktion von HisAF <sub>comII</sub> und HisAF <sub>comIII</sub> durch ProFAR .....	156
4.6.6.5 Zusammenfassung der in Kapitel 4.6 gefundenen Ergebnisse .....	158
4.6.7 Versuche zur Steigerung der TrpF-Aktivität einer aktiven HisAF-Variante .....	160
4.6.7.1 Erstellung einer Genbank auf der Variante HisAF <sub>comIII</sub> .....	162

4.6.7.2 Komplementation von $\Delta trpF$ -Zellen mit der pTNA- <i>hisAFcomIII</i> -Genbank .....	164
4.6.7.2.1 Ergebnis der Selektion auf M9 <sup>-</sup> <sub>Amp</sub> -Selektionsplatten und im M9 <sup>-</sup> <sub>Amp</sub> -Selektionsmedium	164
4.6.7.3 Retransformation der $\Delta trpF$ -Zellen mit den isolierten HisAF <i>comIII</i> -Varianten .....	166
4.6.7.4 Expression, Reinigung und <i>in vitro</i> Charakterisierung selektierter HisAF <i>comIII</i> -Varianten	167
4.6.7.4.1 Gezielte Kombination von Austauschen .....	169
4.6.7.5 Vorversuch mit einem <i>ssrA</i> -Abbautag .....	171
4.6.7.6 Sättigungsmutagenese in einem ausgewählten Bereichen von HisAF .....	172
4.6.7.6.1 Umfasst die Genbank pTNA- <i>hisAFcomII_loop5</i> -NNS alle theoretisch möglichen Varianten? .....	173
4.6.7.6.2 Komplementation von $\Delta trpF$ -Zellen mit der pTNA- <i>hisAFcomII_loop5</i> -NNS-Genbank ....	174
4.6.7.6.3 Expression, Reinigung und <i>in vitro</i> Charakterisierung selektierter HisAF- <i>comII_loop5</i> - Varianten.....	177
4.6.8 Einfluss gefundener Austausche auf die TrpF-Aktivität von HisA-H75Y+F111S+D127V und HisF-D130V.....	179
4.6.8.1 Einfluss auf die TrpF-Aktivität von HisA-H75Y+F111S+D127V .....	179
4.6.8.2 Ligandenbindung an HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V.....	184
4.6.8.2.1 Bindung von rCdRP an HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V.....	184
4.6.8.2.2 Kompetitive Inhibition der TrpF-Aktivität durch ProFAR bei der Variante HisA- H75Y+F111S+D127V+D169V.....	186
4.6.8.3 Die Röntgenkristallstruktur von HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V.....	187
4.6.8.4 Einfluss auf die TrpF-Aktivität von HisF-D130V.....	190
<b>4.7 Etablierung von HisA-, HisF- und TrpC-Aktivität auf der Chimäre HisAF .....</b>	<b>192</b>
4.7.1 HisA- und HisF-Aktivität .....	192
4.7.2 TrpC-Aktivität .....	195
<b>4.8 Etablierung einer Protein-Protein Interaktion zwischen HisAF und HisH .....</b>	<b>197</b>
4.8.1 Planung und Konstruktion der HisAF-Interaktionsvarianten .....	197
4.8.2 <i>Yeast-2-hybrid</i> Test zur Untersuchung der Komplexbildung <i>in vivo</i> .....	199
<b>5 ABSCHLIEßENDE DISKUSSION .....</b>	<b>203</b>
<b>5.1 Das artifizielle (<math>\beta\alpha</math>)<sub>8</sub>-<i>Barrel</i> Enzym HisAF .....</b>	<b>203</b>
5.1.1 Erhöhung der Löslichkeit und Stabilität von HisAF .....	204
5.1.2 Etablierung von TrpF-Aktivität auf HisAF .....	206
<b>5.2 Etablierung wildtypähnlicher TrpF-Aktivität auf HisA .....</b>	<b>208</b>
<b>5.3 Enzymdesign: Rationales Design versus gerichtete Evolution .....</b>	<b>211</b>
<b>5.4 Implikationen der gefundenen Ergebnisse für die Evolution der (<math>\beta\alpha</math>)<sub>8</sub>-<i>Barrel</i> Faltung</b>	<b>213</b>
<b>5.5 Ausblick .....</b>	<b>216</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>218</b>
<b>7 ANHANG .....</b>	<b>230</b>
<b>7.1 Ausbeuten von ausgewählten Proteinvarianten.....</b>	<b>230</b>
<b>7.2 Refraktometrische Bestimmung der Harnstoffkonzentration .....</b>	<b>231</b>

---

<b>7.3 Expression und Reinigung der Hilfsenzyme yPRT und tmTrpC .....</b>	<b>231</b>
<b>7.4 Proteinsequenzen der verwendeten Konstrukte .....</b>	<b>233</b>
<b>7.5 DNA-Sequenzen der verwendeten Konstrukte .....</b>	<b>234</b>
<b>7.6 Kurzprotokoll zur Herstellung von Genbanken .....</b>	<b>236</b>
<b>8 DANKSAGUNG .....</b>	<b>238</b>
<b>9 ERKLÄRUNG .....</b>	<b>240</b>
<b>10 LEBENS LAUF .....</b>	<b>241</b>

# Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Die $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Faltung. ....	7
<b>Abbildung 2:</b> $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyme katalysieren analoge Reaktionen in der Histidin- und Tryptophanbiosynthese. ....	8
<b>Abbildung 3:</b> Konstruktion des aus zwei ursprünglich identischen HisF-C Hälften bestehenden $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyms HisF-C***C. ....	13
<b>Abbildung 4:</b> Konstruktion einer CheYHisF Chimäre. ....	14
<b>Abbildung 5:</b> Multiple Klonierungsstelle und 3'-seitig angrenzender Bereich von pER13a. ....	24
<b>Abbildung 6:</b> Multiple Klonierungsstelle von pCFN1. ....	26
<b>Abbildung 7:</b> pHCE-IIB-Vektor mit MCS und flankierenden Sequenzen. ....	27
<b>Abbildung 8:</b> Das <i>yeast-2-hybrid</i> System detektiert Komplexbildung zwischen zwei Proteinen <i>in vivo</i> . ....	57
<b>Abbildung 9:</b> Schematische Darstellung der partiell komplementären Primer für eine QuickChange-PCR. ....	65
<b>Abbildung 10:</b> Schematische Darstellung des Vorgehens einer Probeexpression. ....	71
<b>Abbildung 11:</b> Schematische Darstellung der Auswertung eines Auffaltungsexperiments. ....	83
<b>Abbildung 12:</b> N- und C-terminale Hälften der $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyme HisA (blau) und HisF (grün) wurden wechselseitig zu den Chimären HisAF und HisFA kombiniert. ....	89
<b>Abbildung 13:</b> Reinigung von rekombinantem HisAF, dokumentiert über SDS-PAGE (12,5 % Polyacrylamid). ....	90
<b>Abbildung 14:</b> Kristall von HisAF. ....	91
<b>Abbildung 15:</b> Kristallstruktur von HisAF. ....	91
<b>Abbildung 16:</b> Analytische Gelfiltration von HisAF und HisAF-25. ....	92
<b>Abbildung 17:</b> Salzbrückenbindung zwischen Arg16 und Glu228 in HisA. ....	94
<b>Abbildung 18:</b> Vergleich der Löslichkeiten (A) und der konformationellen Stabilität (B) von HisAF-F226E mit HisAFwt. ....	95
<b>Abbildung 19:</b> Blick auf das Salzbrückencluster von HisF am Stabilitätspol (A) und die entsprechende Konstellation in HisAF (B). ....	96
<b>Abbildung 20:</b> Vergleich der Löslichkeiten (A) und der konformationellen Stabilität (B) von HisAF-Ins. [M+L+A]+M1K+L2R+T45D+L46E+Y140H mit HisAFwt. ....	98
<b>Abbildung 21:</b> Vergleich der Löslichkeiten (A) und der konformationellen Stabilität (B) von HisAF-Y140H, HisAF-V231M und HisAF-Y140H+V231M im Vergleich zu HisAFwt. ....	100
<b>Abbildung 22:</b> Schematische Darstellung des modifizierten CAT-Fusions-Vektors pCFN1_Stopp. ....	102
<b>Abbildung 23:</b> Multiple Klonierungsstelle von pCFN1, pCFN1_Stopp sowie der Religanden R1 und R2 aus der Selektion auf HisAF-Varianten mit verbesserter Löslichkeit. ....	103
<b>Abbildung 24:</b> Die Biolumineszenz der Kristallqualle <i>Aequorea victoria</i> . ....	104
<b>Abbildung 25:</b> Röntgenstruktur von GFP mit Chromophor bestehend aus Ser65, Tyr66 und Gly67. ....	104
<b>Abbildung 26:</b> Histogramme der FACS-Analyse von <i>E. coli</i> Rosetta(DE3)pLysS Zellen mit GFP-Fusionen von HisAF, HisA und HisF (A) und Analyse der Löslichkeit der isolierten Proteine (B). ....	106
<b>Abbildung 27:</b> Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von <i>E. coli</i> Rosetta(DE3)pLysS Zellen nach heterologer Expression von HisAF-GFP (A), HisA-GFP (B) und HisF-GFP (C). ....	106
<b>Abbildung 28:</b> GFP-Fluoreszenz von <i>E. coli</i> Rosetta(DE3)pLysS Zellen sowie der unlöslichen und löslichen Zellfraktion, nach heterologer Expression von HisAF-GFP, HisA-GFP und HisF-GFP. ....	107

<b>Abbildung 29:</b> Analytische FACS-Histogramme der Anreicherungsrounden 1, 3 und 5 der <i>hisAF</i> -Genbank (A) und Anreicherungsrunde 5 mit anschließendem „Resort“ (B).....	110
<b>Abbildung 30:</b> Analyse der Sortierung der <i>hisAF</i> -Genbank mittels Kolonie-PCR am Beispiel von jeweils 20 zufällig ausgewählten Kolonien aus dem „Resort“ der vierten und fünften Anreicherung (1%iges Agarosegel).....	110
<b>Abbildung 31:</b> SDS-PAGE Analyse von zehn zufällig ausgewählten Klonen der in Abbildung 30 dokumentierten Kolonie-PCR.....	111
<b>Abbildung 32:</b> Sequenzausschnitt des <i>hisAF</i> -Gens von Base 685 bis 699. ....	111
<b>Abbildung 33:</b> Analytische FACS-Histogramme der Anreicherungsrounden 1, 2 und 4 der <i>hisA<sub>rand</sub>F</i> -Genbank (A) und Anreicherungsrunde 4 mit anschließendem „Resort“ (B).....	115
<b>Abbildung 34:</b> Analyse der Sortierung der <i>hisA<sub>rand</sub>F</i> -Genbank mittels Kolonie-PCR am Beispiel der Kolonien #24 bis #45 aus dem „Resort“ der vierten Anreicherung (1%iges Agarosegel). ....	116
<b>Abbildung 35:</b> GFP-Fluoreszenz der löslichen Zellfraktion von aus der pER13a- <i>hisA<sub>rand</sub>F</i> -Genbank isolierten <i>E. coli</i> Rosetta(DE3)pLysS Zellen.....	117
<b>Abbildung 36:</b> GFP-Fluoreszenz von <i>E. coli</i> Rosetta(DE3)pLysS Zellen, sowie der unlöslichen und löslichen Zellfraktion der im <i>in vivo Screening</i> isolierten <i>HisA<sub>rand</sub>F</i> -GFP-Varianten im Vergleich zu <i>HisAFwt</i> -GFP. ....	118
<b>Abbildung 37:</b> Analytische FACS-Histogramme der im <i>in vivo Screening</i> isolierten <i>HisA<sub>rand</sub>F</i> -Varianten (grün) im Vergleich zu <i>HisAFwt</i> (schwarz). ....	119
<b>Abbildung 38:</b> Löslichkeitsanalyse der isolierten <i>HisA<sub>rand</sub>F</i> -Varianten im Vergleich zu <i>HisAFwt</i> . ....	120
<b>Abbildung 39:</b> Vergleich der konformationellen Stabilität der isolierten <i>HisA<sub>rand</sub>F</i> -Varianten (grün) im Vergleich zu <i>HisAFwt</i> (schwarz). ....	122
<b>Abbildung 40:</b> Modell von <i>HisAF</i> -A6E. ....	122
<b>Abbildung 41:</b> Löslichkeitsanalyse der kombinierten <i>HisA<sub>rand</sub>F</i> -Varianten (grün) im Vergleich zu den Ausgangsvarianten und <i>HisAFwt</i> . ....	125
<b>Abbildung 42:</b> Vergleich der konformationellen Stabilität von <i>HisAF</i> -A6E+D8V (A; ●) und <i>HisAF</i> -A6E+D8V+K13R+T25S+K113E (B; ●) im Vergleich zu den Ausgangskonstrukten und <i>HisAFwt</i> (●). ...	126
<b>Abbildung 43:</b> Löslichkeitsanalyse der kombinierten Variante <i>HisAF</i> -D8V+Y140H+F226E (grün) im Vergleich zu den Ausgangsvarianten (grau) und <i>HisAFwt</i> (schwarz). ....	127
<b>Abbildung 44:</b> Vergleich der konformationellen Stabilität (A) von <i>HisAF</i> -D8V+Y140H+F226E (●) mit den Ausgangskonstrukten <i>HisAF</i> -D8V (▲) und <i>HisAF</i> -Y140H+F226E (▼) und <i>HisAFwt</i> (●) durch Denaturierung in Harnstoff und daraus abgeleitete thermodynamische Stabilitäten $\Delta G(H_2O)$ (B)...	128
<b>Abbildung 45:</b> Analytische Gelfiltration der <i>HisFA</i> Varianten #1 und 2 im Vergleich zu <i>HisFAwt</i> . ....	131
<b>Abbildung 46:</b> Wachstumskurven von <i>E. coli</i> $\Delta trpF$ -Zellen in M9 <sup>-</sup> <sub>Amp</sub> -Selektionsmedium nach Transformation mit verschiedenen in pTNA klonierten Genkonstrukten. ....	137
<b>Abbildung 47:</b> Strukturmodell von <i>HisAF</i> mit einer Auswahl von im Komplementationstest auf TrpF-Aktivität identifizierten mutierten Positionen. ....	138
<b>Abbildung 48:</b> Exemplarische Reinigung eines rekombinanten <i>HisAF</i> -Proteins aus dem löslichen Zellextrakt.....	142
<b>Abbildung 49:</b> Vergleich der Löslichkeiten (A) und der konformationellen Stabilität (B) von <i>HisAF</i> - <i>sell</i> <sup>+</sup> <i>HisAF</i> - <i>sell</i> <sup>+</sup> im Vergleich zu <i>HisAF</i> -Y140H+V231M und <i>HisAFwt</i> . ....	144
<b>Abbildung 50:</b> PRA-Sättigungskurven zur Quantifizierung der TrpF-Aktivitäten von <i>HisAF</i> -Y140H+D127V (grün) und <i>HisAF</i> -Y140H+V231M+D127V (rot). ....	146
<b>Abbildung 51:</b> TrpF-Aktivität <i>in vitro</i> der gereinigten <i>HisAF</i> -Y140H+D8N+D127V-Variante (rot) im Vergleich zu <i>HisAF</i> -Y140H+D127V (schwarz), gemessen als Umsatzkurve unter Fließgleichgewichtsbedingungen. ....	147
<b>Abbildung 52:</b> PRA-Sättigungskurve zur Quantifizierung der TrpF-Aktivität von <i>HisAFcomI</i> . ....	149



<b>Abbildung 53:</b> PRA-Sättigungskurve zur Quantifizierung der TrpF-Aktivität von HisAFcomII. ....	151
<b>Abbildung 54:</b> PRA-Sättigungskurve zur Quantifizierung der TrpF-Aktivität von HisAFcomIII. ....	153
<b>Abbildung 55:</b> FRET-Titration von HisAFcomIII mit rCdRP. ....	155
<b>Abbildung 56:</b> Bindung von rCdRP an HisAFcomIII. ....	156
<b>Abbildung 57:</b> PRA-Sättigungskurven der TrpF-Aktivität von HisAFcomII (A) und HisAFcomIII (B) zur Quantifizierung der kompetitiven Inhibition durch ProFAR. ....	156
<b>Abbildung 58:</b> Linearer Teil der PRA-Sättigungskurve ( $[S] \ll K_M^{PRA}$ ) von HisAFcomII in Gegenwart von 100 $\mu$ M ProFAR. ....	158
<b>Abbildung 59:</b> Schematische Darstellung der Kombination von Austausch aus selektierten HisAF-Varianten mit TrpF-Aktivität. ....	159
<b>Abbildung 60:</b> PRA-Sättigungskurve zur Quantifizierung der TrpF-Aktivität von HisAFcomIII+L2H+V3I+F10Y+K144N. ....	169
<b>Abbildung 61:</b> Vergleich der Kinetik der Präzipitation von HisAFcomIII (●) und HisAFcomIII+L2H+V3I+F10Y+K144N (●) (A) und der konformationellen Stabilität der genannten Varianten mit HisAFwt (●) durch Denaturierung in Harnstoff (B). ....	170
<b>Abbildung 62:</b> PRA-Sättigungskurven zur Quantifizierung der TrpF-Aktivität von HisA-H75Y+F111S+D127V (A) und HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V (B). ....	180
<b>Abbildung 63:</b> PRA-Sättigungskurven zur Quantifizierung der TrpF-Aktivität von HisA-H75Y+D69V (A), HisA-H75Y+F111S+D169V (B), HisA-H75Y+F111L+D127V+D169V (C) und HisA-D8N+H75Y+F111S+D127V+D169V (D). ....	183
<b>Abbildung 64:</b> Titration von HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V mit rCdRP. ....	185
<b>Abbildung 65:</b> Bindung von rCdRP an HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V. ....	186
<b>Abbildung 66:</b> PRA-Sättigungskurven der TrpF-Aktivität von HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V zur Quantifizierung der kompetitiven Inhibition durch ProFAR. ....	187
<b>Abbildung 67:</b> Kristall von HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V. ....	188
<b>Abbildung 68:</b> Bänderdiagramm der Kristallstruktur von HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V. ....	189
<b>Abbildung 69:</b> PRA-Sättigungskurve zur Quantifizierung der TrpF-Aktivität von HisF-D130V+Y143H+K143E+T149M+ D176V. ....	190
<b>Abbildung 70:</b> Wachstumskurven von <i>E. coli</i> $\Delta hisA\Delta hisF$ -Zellen in $M9_{Amp}^-$ -Selektionsmedium nach Transformation mit verschiedenen in pTNA klonierten Genkonstrukten. ....	195
<b>Abbildung 71:</b> Komplementationstest mit $\Delta trpC$ -Zellen. ....	196
<b>Abbildung 72:</b> Analyse der Kontaktfläche zwischen HisF und HisH. ....	198
<b>Abbildung 73:</b> Strukturbasiertes Sequenzalignment der N-terminalen Bereiche von HisA und HisF. ....	199
<b>Abbildung 74:</b> yeast-2-hybrid Test mit ausgewählten Konstrukten. ....	201
<b>Abbildung 75:</b> yeast-2-hybrid Test mit Varianten von HisAF #5+L46E. ....	202
<b>Abbildung 76:</b> Vergleich der Lage der gebundenen Phosphate in HisAF und HisF. ....	207
<b>Abbildung 77:</b> Vergleich der katalytisch essenziellen Aminosäuren von PriA mit den an gleicher Position liegenden Aminosäuren in HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V. ....	210
<b>Abbildung 78:</b> Durch HisA bzw. TrpF katalysierte Amadori-Umlagerung. ....	212
<b>Abbildung 79:</b> Schema der Evolution von $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzymen aus $(\beta\alpha)_4$ -Halbbarrel Proteinen durch Genduplikation und Genfusion. ....	214
<b>Abbildung 80:</b> Schema der Evolution von $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzymen aus $(\beta\alpha)_4$ Halbbarrel Proteinen durch Genduplikation, Fusion, Diversifikation und Rekombination. ....	215
<b>Abbildung 81:</b> Ergebnis der Aufreinigung der Hilfsenzyme tmTrpC und yPRT, verfolgt über SDS-PAGE (12,5 % Polyacrylamid). ....	232

# Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Extinktionskoeffizienten und molare Masse (MW) der verwendeten Proteine und Substrate bzw. Liganden. ....	78
<b>Tabelle 2:</b> Zusammensetzung 12,5 %iger SDS-PAGE Gele. ....	79
<b>Tabelle 3:</b> Fluoreszenzemissionsmaxima von HisAF und HisAF-25. ....	93
<b>Tabelle 4:</b> Vergleich der Stabilität von HisAFwt und HisAF-F226E nach Denaturierung in Harnstoff. .	95
<b>Tabelle 5:</b> Wachstum transformierter <i>E. coli</i> JM101 Zellen auf LB-Platten in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von Chloramphenicol. ....	102
<b>Tabelle 6:</b> Wachstum transformierter <i>E. coli</i> JM101 Zellen auf LB-Selektionsplatten in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von Chloramphenicol. ....	103
<b>Tabelle 7:</b> Übersicht über die FACS-basierte Anreicherung von <i>E. coli</i> Rosetta(DE3)pLysS Zellen mit der <i>hisAF</i> -Genbank. ....	109
<b>Tabelle 8:</b> Übersicht über die FACS-basierte Anreicherung von <i>E. coli</i> Rosetta(DE3)pLysS Zellen mit der <i>hisA<sub>rand</sub>F</i> -Genbank. ....	114
<b>Tabelle 9:</b> Ergebnis des <i>in vivo Screenings</i> der <i>hisA<sub>rand</sub>F</i> -Genbank am FACS. ....	117
<b>Tabelle 10:</b> Ergebnis der Löslichkeitsanalyse der HisA <sub>rand</sub> F-Varianten. ....	121
<b>Tabelle 11:</b> Ausbeuten bei der Reinigung von mittels FACS isolierten HisA <sub>rand</sub> F-Varianten und der daraus kombinierten HisAF-Varianten. ....	125
<b>Tabelle 12:</b> Vergleich der Stabilität von HisAFwt, HisAF-D8V, HisAF-Y140H+F226E und HisAF-D8V+Y140H+F226E nach Denaturierung der Proteine in Harnstoff. ....	129
<b>Tabelle 13:</b> Anzahl und Verteilung der Nukleotid-Austausche bei zehn zufällig ausgewählten Klonen der <i>hisAF</i> Genbank zur Etablierung von TrpF-Aktivität. ....	134
<b>Tabelle 14:</b> Ergebnis der Komplementation von $\Delta trpF$ -Zellen mit der pTNA- <i>malE</i> - <i>hisAF</i> -Genbank. .	137
<b>Tabelle 15:</b> Ergebnis der Komplementation nach Retransformation von $\Delta trpF$ -Zellen mit den selektierten pTNA- <i>malE</i> - <i>hisAF</i> -Varianten. ....	140
<b>Tabelle 16:</b> Selektierte HisAF-Varianten, die gereinigt und auf TrpF-Aktivität <i>in vitro</i> untersucht wurden. ....	141
<b>Tabelle 17:</b> <i>Steady-state</i> enzymkinetische Parameter der TrpF-Aktivität der selektierten HisAF-Varianten. ....	143
<b>Tabelle 18:</b> <i>Steady-state</i> enzymkinetische Parameter der TrpF-Aktivität von HisAF-Y140H und HisAF-Y140H+V231M+D127V. ....	146
<b>Tabelle 19:</b> <i>Steady-state</i> enzymkinetische Parameter der TrpF-Aktivität von HisAFcomI. ....	149
<b>Tabelle 20:</b> <i>Steady-state</i> enzymkinetische Parameter der TrpF-Aktivität von HisAFcomII. ....	151
<b>Tabelle 21:</b> <i>Steady-state</i> enzymkinetische Parameter der TrpF-Aktivität von HisAFcomIII im Vergleich zu ausgewählten Referenzproteinen. ....	153
<b>Tabelle 22:</b> <i>Steady-state</i> enzymkinetische Parameter der TrpF-Aktivität von HisAFcomII und HisAFcomIII in An- und Abwesenheit von ProFAR. ....	157
<b>Tabelle 23:</b> Übersicht über die <i>steady-state</i> enzymkinetischen Parameter der TrpF-Aktivität und die Ligandenaffinität charakterisierter HisAF-Varianten im Vergleich zu ausgewählten Referenzproteinen. ....	160
<b>Tabelle 24:</b> Komplementationsdauer von $\Delta trpF$ -Zellen mit den angegebenen pTNA- <i>hisAFcomI</i> –III Varianten auf M9 <sup>-</sup> -Selektionsmedium bei 37 °C und 25 °C. ....	161
<b>Tabelle 25:</b> Anzahl und Verteilung der Nukleotidaustausche bei zehn zufällig ausgewählten Klonen der <i>hisAFcomIII</i> Genbank. ....	163
<b>Tabelle 26:</b> Ergebnis der Komplementation von $\Delta trpF$ -Zellen mit der pTNA- <i>hisAFcomIII</i> -Genbank. .	165

<b>Tabelle 27:</b> Ergebnis der Komplementation nach Retransformation von $\Delta trpF$ -Zellen mit den selektierten pTNA- <i>hisAFcomIII</i> -Varianten bei 25 °C (Selektion auf M9 <sup>-</sup> <sub>Amp</sub> -Selektionsplatte) und 37 °C (Selektion in M9 <sup>-</sup> <sub>Amp</sub> -Flüssigmedium). .....	166
<b>Tabelle 28:</b> <i>Steady-state</i> enzymkinetische Parameter der TrpF-Aktivität der selektierten HisAFcomIII-Varianten. ....	168
<b>Tabelle 29:</b> <i>Steady-state</i> enzymkinetische Parameter der TrpF-Aktivität von HisAFcomIII+L2H+V3I+F10Y+K144N im Vergleich mit dem Ausgangsprotein HisAFcomIII. ....	169
<b>Tabelle 30:</b> Verteilung der Nukleotide in den randomisierten Codonen von F138, K143, K144 und T146 der pTNA- <i>hisAFcomII_loop5</i> -NNS-Genbank. ....	173
<b>Tabelle 31:</b> Ergebnis der Komplementation von $\Delta trpF$ -Zellen mit der pTNA- <i>hisAFcomII_loop5</i> -NNS-Genbank. ....	175
<b>Tabelle 32:</b> Prozentuale Anteile der gefundenen Reste in der <i>hisAFcomII_loop5</i> -NNS-Genbank nach den chemischen Eigenschaften der Seitenketten geordnet. ....	176
<b>Tabelle 33:</b> Ergebnis der Komplementation nach Retransformation von $\Delta trpF$ -Zellen mit den selektierten pTNA- <i>hisAFcomII_loop5</i> -Varianten bei 30 °C. ....	177
<b>Tabelle 34:</b> <i>Steady-state</i> enzymkinetische Parameter der TrpF-Aktivität der selektierten HisAFcomII- <i>loop5</i> -Varianten. ....	178
<b>Tabelle 35:</b> <i>Steady-state</i> enzymkinetische Parameter der TrpF-Aktivität von HisA-H75Y+F111S+D127V und HisA-H75Y+F111S+D169V im Vergleich zu ausgewählten Referenzproteinen. ....	180
<b>Tabelle 36:</b> <i>Steady-state</i> enzymkinetische Parameter der TrpF-Aktivität von HisA-H75Y+F111S+D127V und HisA-H75Y+F111S+D169V im Vergleich zu ausgewählten Referenzproteinen. ....	183
<b>Tabelle 37:</b> <i>Steady-state</i> enzymkinetische Parameter der TrpF-Aktivität von HisF-D130V+Y143H+K146E+T149M+D176V im Vergleich zu HisF-D130V als Referenzprotein. ....	191
<b>Tabelle 38:</b> Übersicht der verwendeten Genbanken zur Etablierung von HisA und HisF-Aktivität auf HisAF. ....	192
<b>Tabelle 39:</b> Ergebnis der Komplementation von $\Delta trpC$ -Zellen mit der pTNA- <i>hisAFcomIII</i> -Genbank. ....	197
<b>Tabelle 40:</b> Ausbeuten bei der Reinigung ausgewählter Proteinvarianten. ....	230

# Formelverzeichnis

<b>Formel 1:</b> Berechnung der Transformationseffizienz. ....	51
<b>Formel 2:</b> Bestimmung der DNA-Konzentration. ....	59
<b>Formel 3:</b> Berechnung der Schmelztemperatur eines Oligonukleotids. ....	62
<b>Formel 4:</b> Berechnung der optimalen Anlagerungstemperatur der Primer in einer PCR-Reaktion. ....	62
<b>Formel 5:</b> Berechnung der durchschnittlichen Basenaustausche pro Gen durch <i>ep</i> PCR. ....	68
<b>Formel 6:</b> Bestimmung der Anzahl der transformierten Zellen. ....	69
<b>Formel 7:</b> Bestimmung der Ligationseffizienz in Prozent. ....	69
<b>Formel 8:</b> Bestimmung der Größe einer Genbank aus Formel 6 und Formel 7. ....	69
<b>Formel 9:</b> Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{280}$ . ....	77
<b>Formel 10:</b> Berechnung des spezifischen Extinktionskoeffizienten $^{0,1\%}_{A_{280}}$ . ....	77
<b>Formel 11:</b> Berechnung der Proteinkonzentration mit Hilfe des spezifischen Extinktionskoeffizienten $^{0,1\%}_{A_{280}}$ . ....	77
<b>Formel 12:</b> Annahme einer Auffaltung nach dem Zweizustands-Modell. ....	82
<b>Formel 13:</b> Zweizustands-Modell bezogen auf die Messwerte der Auffaltung. ....	82
<b>Formel 14:</b> Bestimmung des Anteils an ungefaltetem Protein aus den bei einem Auffaltungsexperiment gemessenen Signalintensitäten. ....	82
<b>Formel 15:</b> Berechnung der Gleichgewichtskonstante unter Annahme des Zweizustands-Modells. ...	83
<b>Formel 16:</b> Bestimmung der freien Gibbs-Energie-Änderung mit Hilfe der Gleichgewichtskonstanten. ....	83
<b>Formel 17:</b> Abhängigkeit der freien Auffaltungsenthalpie von der Konzentration an Harnstoff. ....	84
<b>Formel 18:</b> Berechnung des $D_{1/2}$ -Wertes aus den Größen in Formel 17. ....	84
<b>Formel 19:</b> Berechnung der Standardabweichung der katalytischen Effizienz $k_{cat}/K_M^{PRA}$ nach dem Gaußschen Fehlerfortpflanzungsgesetz. ....	86
<b>Formel 20:</b> Bestimmung des $K_i$ -Wertes für ProFAR aus den Michaelis-Konstanten $K_M^{PRA}$ und $K_M^{PRA,app}$ . ....	87
<b>Formel 21:</b> Berechnung der Mindestgröße einer Genbank, um mit 99%iger Sicherheit alle theoretisch möglichen Genvarianten vertreten zu haben. ....	174

# Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren wurden gemäß der Einbuchstaben- oder Dreibuchstaben-Schreibweise abgekürzt. Bei Benennungen der Selektivmedien für *S. cerevisiae* wurden die Aminosäuren durch ihre Anfangsbuchstaben abgekürzt.

A	Absorption; Adenosin
AA	Anthranilsäure
Å	Ångström ( $10^{-10}$ m)
$0,1\% A_x$	spezifischer Extinktionskoeffizient bei x nm
$A_{\text{Basen}}$	Durchschnittliche Anzahl der Basenaustausche pro Gen
$a_{\text{Basen}}$	Anzahl der Basenaustausche pro analysiertem Gen
<i>ade2</i>	Phosphoribosylaminoimidazol-Carboxylase aus <i>S. cerevisiae</i>
AICAR	5-Aminoimidazol-4-carboxamid-ribotid
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxosulfid
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
<i>bla</i>	$\beta$ -Lactamase-Gen
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
c	Konzentration
ca.	circa
$C_\alpha$	zentrales C-2 Kohlenstoffatom von Aminosäuren
CAT	Chloramphenicolacetyltransferase
CD	Circular Dichroismus
cm	Zentimeter ( $1 \cdot 10^{-2}$ m)
Crx	<i>Crude extract</i> (lösliche Fraktion eines Zellextrakts)
CSM	Mischung aus Aminosäuren und Nukleotiden ( <i>complete supplement mixture</i> )
C-terminal	Carboxyterminales Ende einer Polypeptidkette
CV	<i>Column Volume</i> (Säulenvolumen)
d	Schichtdicke der Küvette [cm]
$[D_{1/2}]$	Konzentration an Denaturierungsmittel bei welcher die Hälfte des Proteins in nicht-nativem Zustand vorliegt
D-AAT	D-Amino Acid Aminotransferase [EC 2.6.1.21]
Da	Dalton [g/mol]
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat (N= A, C, G oder T)
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
D <sub>x</sub>	x mM DTT
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ecTrpF	TrpF aus <i>E. coli</i>
E <sub>0</sub>	Gesamtkonzentration an Enzym
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
epPCR	<i>error-prone</i> PCR
<i>et al.</i>	und andere (Autoren) ( <i>et alii</i> )
EtBr	Ethidiumbromid
E <sub>x</sub>	x mM EDTA
f	Verdünnungsfaktor
F <sub>N</sub>	Anteil an gefaltetem Protein
F <sub>U</sub>	Anteil an ungefaltetem Protein
G	Guanosin
g	Gramm, Zentrifugalbeschleunigung
GdmCl	Guanidiniumchlorid
h	Stunde
(His) <sub>6</sub> -Tag	Anhang von 6 Histidinen an ein Protein (Hexahistidin-Tag)
<i>his</i>	Gene, die für Enzyme des Histidinbiosyntheseweges kodieren, z.B. kodiert <i>hisF</i> für das Enzym HisF
<i>his3</i>	Imidazolglycerolphosphat Dehydratase aus <i>S. cerevisiae</i>
HisA	ProFAR Isomerase
HisA-N	N-terminale Hälfte von HisA
HisA-C	C-terminale Hälfte von HisA
HisF	Synthase-Untereinheit der Imidazolglycerinphosphat-Synthase
HisF-N	N-terminale Hälfte von HisF
HisF-C	C-terminale Hälfte von HisF
HisF-CC	<i>in tandem</i> fusioniertes HisF-C
HisF-C*C	HisF-CC mit A124R & A220K in N-terminaler Hälfte
HisF-C**C	HisF-C*C mit den Austauschen Y143H & V234M (N-terminal)
HisF-C***C	HisF-C*C mit den Austauschen Y143H & V234M (N- und C-terminal)
Hs	löslicher Überstand des Hitzeschritt
ImGP	Imidazolglycerinphosphat
ImGP-S	Imidazolglycerinphosphat-Synthase
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K	Kelvin; Gleichgewichtskonstante; mögliche Kombinationen einer randomisierten Nukleotidsequenz
K.	gezählte Kolonien
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
k <sub>cat</sub>	Wechselzahl
k <sub>cat</sub> /K <sub>M</sub>	katalytischer Effizienzparameter
K <sub>d</sub>	thermodynamische Dissoziationskonstante

kDa	Kilodalton ( $1 \cdot 10^3$ g/mol)
$K_i$	Inhibitionskonstante
$K_M$	Michaelis-Menten-Konstante, entspricht der Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Geschwindigkeit erreicht wird
KP	Kaliumphosphat Puffer
L	Ligationseffizienz
l	Liter
<i>lacZ</i>	Gen für die $\beta$ -Galactosidase
LB	Luria-Bertani (-Medium)
leu2	3-Isopropylmalat-Dehydrogenase aus <i>S. cerevisiae</i>
ln	natürlicher Logarithmus
log	dekadischer Logarithmus
LUCA	<i>last universal common ancestor</i>
M	Molar [mol/l]; Mutationen pro Gen bei Randomisierung einer Sequenz
m	Betrag der Steigung einer Geraden, Milli ( $1 \cdot 10^{-3}$ )
<i>malE</i>	Gen für das Maltose-Binde-Protein aus <i>E. coli</i>
max.	maximal
mA	Milliampère
MBP	Maltose-Binde-Protein aus <i>E. coli</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MPa	Megapascal
MW	Molekulare Masse
mwco	<i>molecular weight cut off</i>
N	Nativer Zustand eines Proteins; Nukleotidsequenz-Länge in bp
n	nano ( $1 \cdot 10^{-9}$ )
$n_{\text{Kolonien}}$	Anzahl der Kolonien
nm	Nanometer
NNS	Zufallscodon (N = A, T, C oder G; S = G oder C)
$n_{\text{Seq}}$	Anzahl der sequenzierten Gene
$n_T$	Anzahl der transformierten Zellen
N-terminal	aminoterminales Ende einer Polypeptidkette
$OD_x$	optische Dichte bei x nm
OE	<i>Overlap Extension</i>
ori	Replikationsstartpunkt eines Plasmids ( <i>origin of replication</i> )
P	Pellet (unlösliche Fraktion eines Zellextraktes)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PriA	Phosphoribosyl-Isomerase A
PRFAR	N'-[(5'-phosphoribulosyl)-formimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamid-ribonukleotid

ProFAR	N'-[(5'-phosphoribosyl)-formimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamid-ribonukleotid
PRPP	5-Phosphoribosyl- $\alpha$ -1-Pyrophosphat
PRT	Anthranilat-Phosphoribosyltransferase
<i>Pwo</i>	<i>Pyrococcus woesei</i>
R	Allgemeine Gaskonstante ( $8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ )
<i>rmsd</i>	<i>root mean square deviation</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Mindestgröße einer Genbank
s	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
scPriA	PriA aus <i>Streptomyces coelicolor</i>
SCOP	<i>Structural Classification of Proteins</i>
SD	Minimalmedium zur Anzucht von Hefen ( <i>synthetic dropout</i> )
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
ssDNA	einzelsträngige DNA
T	Temperatur; Thymidin
<i>T. maritima</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
$T_A$	<i>Annealing</i> -Temperatur
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
$T_E$	Transformationseffizienz
$T_M$	Schmelztemperatur eines Oligonukleotids
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TIM	Triosephosphatisomerase
tmHisA	HisA aus <i>T. maritima</i>
tmTrpF	TrpF aus <i>T. maritima</i>
tmTrpC	TrpC aus <i>T. maritima</i>
<i>trp</i>	Gene, die für Enzyme des Tryptophanbiosyntheseweges kodieren
<i>trp1</i>	Phosphoribosylanthranilat Isomerase aus <i>S. cerevisiae</i>
TrpF	Phosphoribosylanthranilat Isomerase
Ts	Transitionen
Tv	Transversionen
U	<i>Unit</i> , 1U entspricht der Menge an Enzym, die unter Standardbedingungen 1 $\mu\text{mol}$ Substrat pro Minute umsetzt; denaturierter Zustand eines Proteins
u.a.	unter anderem
UAS	<i>upstream activation sequence</i> ; <i>upstream activating site of transcription</i>
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
$v_i$	Anfangsgeschwindigkeit
$V_{\text{max}}$	maximale Umsatzgeschwindigkeit
Vol	Volumen



---

( $^v/v$ )	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
( $^w/v$ )	Masse pro Volumen
$y_N$	Signal von vollständig gefaltetem Protein
YPD	Vollmedium zur Anzucht von Hefen ( <i>yeast peptone dextrose</i> )
yPRT	PRT aus <i>S. cerevisiae</i>
$y_U$	Signal von vollständig entfaltetem Protein
z.B.	zum Beispiel
Ø	Durchmesser
$\Delta$	Differenz
$\Delta_{his}$	<i>E. coli</i> Stamm mit Defizienz für die Aktivität des Enzyms des Histidinbiosyntheseweges
$\Delta G$	freie Energie
$\Delta_{trp}$	<i>E. coli</i> Stamm mit Defizienz für die Aktivität des Enzyms des Tryptophanbiosyntheseweges
$\epsilon_x$	molarer Extinktionskoeffizient bei x nm
$\lambda$	Wellenlänge
$\mu$	Mikro ( $1 \cdot 10^{-6}$ )
$\mu g$	Mikrogramm
$\mu l$	Mikroliter
$\mu M$	Mikromolar
$\theta_{MRW}$	durchschnittliche Elliptizität pro Aminosäure
$\theta_{obs}$	gemessene Elliptizität

## Zusammenfassung

---

In der vorliegenden Dissertation wurde die molekulare Evolution neuer  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* Enzyme durch die Rekombination von existierenden  $(\beta\alpha)_4$ -Halb*barreln* experimentell untersucht.

Dieser Arbeit liegt das Modell zugrunde, wonach die Vielfalt heutiger  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* Enzyme durch eine Reihe von Duplikationen, Fusionen und Rekombinationen aus einem gemeinsamen Vorfahren halber Länge - dem  $(\beta\alpha)_4$ -Halb*barrel* – entstanden ist. In bisherigen Arbeiten konnte durch Duplikation und Fusion eines  $(\beta\alpha)_4$ -Halb*barrels* und anschließender Optimierung der Kontaktfläche ein stabiles  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* Enzym hergestellt werden. Um auch den Mechanismus der Genrekombination experimentell nachzuvollziehen, wurden aus den  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* Enzymen ProFAR Isomerase (HisA) und Imidazolglycerinphosphat Synthase (HisF) aus *Thermotoga maritima* chimäre Proteine hergestellt. Dazu wurde das N-terminale  $(\beta\alpha)_4$ -Halb*barrel* von HisA mit dem C-terminalen  $(\beta\alpha)_4$ -Halb*barrel* von HisF zu HisAF kombiniert, sowie in analoger Weise HisFA erzeugt. Biophysikalische Charakterisierungen der Chimären im Vorfeld dieser Arbeit deuteten darauf hin, dass es sich insbesondere bei HisAF um ein kompaktes Protein mit definierter Struktur handelt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nunmehr katalytische Aktivität auf HisAF etabliert werden. Um eine rationale Basis für entsprechende Mutationen zu erhalten, wurde das Protein kristallisiert und seine Struktur in Kooperation mit Dr. Birte Höcker (Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Abteilung Proteinevolution, Tübingen) mit einer Auflösung von 4 Å aufgeklärt. Die Struktur zeigt, dass sich die Sekundärstrukturelemente zu einem  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* zusammenlagern, jedoch sind Aussagen über die exakte Lage der Aminosäureseitenketten nicht möglich. Um eine Struktur in höherer Auflösung zu erhalten, wurden die Stabilität und Löslichkeit von HisAF, welches ausschließlich in unlöslicher Form in *Escherichia coli* produziert wird und durch Rückfaltung gereinigt werden muss, durch Proteindesign erhöht. Dabei kam eine Kombination aus rationalem Design auf der Basis eines Homologiemodells und gerichteter Evolution unter Verwendung des „Grün Fluoreszierenden Proteins“ als Reporterprotein zum Einsatz. Die resultierende HisAF-D8V+Y140H+F226E

Variante wurde zu 60 % löslich in *E. coli* produziert und war mit einem  $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ -Wert von 65 kJ/mol stabiler als die meisten natürlich vorkommenden Proteine, konnte jedoch nicht kristallisiert werden.

Da somit für die Etablierung katalytischer Aktivität auf HisAF keine hoch aufgelöste Struktur zur Verfügung stand, wurde dazu ein Ansatz der gerichteten Evolution gewählt. Auf den Elternenzymen HisA und HisF konnte bereits schwache PRA-Isomerase (TrpF) Aktivität etabliert werden, weswegen dies ebenfalls für HisAF versucht wurde. Dazu wurden Zellen eines *trpF*-Deletionsstammes ( $\Delta trpF$ ) mit einer durch fehlerbehaftete PCR hergestellten *hisAF*-Genbank transformiert und mittels *in vivo* Komplementation in festem bzw. flüssigem Minimalmedium ohne Tryptophan auf aktive Varianten selektiert. Vier der komplementierenden HisAF-Varianten, die zwischen 1–5 Aminosäureaustausche trugen, wurden exprimiert, gereinigt und charakterisiert. Die rekombinanten Proteine zeigten schwache TrpF-Aktivität *in vitro* ( $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{PRA}} = 0,1\text{--}6,8 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ ), die jedoch durch die gezielte Kombination von Austauschen schrittweise um mehrere Größenordnungen verbessert werden konnte. Die beste Variante HisAFcomIII, die insgesamt sieben Aminosäureaustausche enthält, weist einen  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{PRA}}$  von  $1425 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$  auf. Während die Wechselzahl mit  $4 \text{ min}^{-1}$  etwa 50-fach unterhalb der wildtypischer TrpF Enzyme liegt, entsprechen die Werte für die Michaeliskonstante ( $K_{\text{M}}^{\text{PRA}} = 2,9 \text{ }\mu\text{M}$ ) und die Dissoziationskonstante für die Bindung eines Produktanalogons ( $K_{\text{d}}^{\text{rCDRP}} = 5,6 \text{ }\mu\text{M}$ ) weitgehend den entsprechenden Werten für TrpF aus *E. coli*. Die Herstellung weiterer Genbanken auf der Basis von HisAFcomIII führte zur Isolierung schneller komplementierender Varianten, deren TrpF-Aktivität *in vitro* jedoch nur unwesentlich erhöht war. Vermutlich geht die verbesserte *in vivo* Aktivität dieser Proteine auf eine erhöhte konformationelle Stabilität zurück.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden ausgewählte Mutationen, die bei der Selektion auf TrpF-Aktivität von HisAF gefunden wurden, in die Elternenzyme HisA und HisF übertragen. Die bereits früher gefundene geringe TrpF-Aktivität von HisF-D130V konnte dadurch nur geringfügig verbessert werden. Hingegen führte in der früher charakterisierten HisA-H75Y+F111S+D127V Variante der zusätzliche Austausch D169V zu einer drastischen Erhöhung der Aktivität auf  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{PRA}} = 4335 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ . Besonders bemerkenswert ist, dass die Wechselzahl dieses Proteins mit  $67 \text{ min}^{-1}$

etwa 30 % des Wertes für TrpF aus *T. maritima* erreicht und höher liegt als die Wechselzahl von wildtypischem HisA für die native HisA-Reaktion. In Kooperation mit Dr. Birte Höcker wurde diese HisA-Variante kristallisiert und ihre Röntgenstruktur mit einer Auflösung von 1,8 Å aufgeklärt. Derzeit wird PRA in das aktive Zentrum des Proteins modelliert, um die mechanistischen Grundlagen für die hohe TrpF-Aktivität zu verstehen.

Im letzten Teil der Arbeit wurde versucht durch rationales Design eine Protein-Protein Interaktion von HisAF mit HisH, dem natürlichen Interaktionspartner von HisF, herzustellen. Dazu wurde die Kontaktfläche zwischen HisF und HisH analysiert und an der Interaktion beteiligte Reste in der N-terminalen Hälfte von HisF in HisAF übertragen. Mit Hilfe des *yeast-2-hybrid* Systems wurde eine Wechselwirkung zwischen der HisAF Mutante und HisH nachgewiesen, die nun *in vitro* genauer charakterisiert werden kann.

Insgesamt unterstützen die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse die Hypothese, dass es im Verlauf der Evolution der  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* Enzyme zur Rekombination von  $(\beta\alpha)_4$ -Halbbarreln gekommen ist. Sie zeigen weiterhin, dass sich das  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* Proteingerüst zur *de novo* Etablierung wildtypähnlicher enzymatischer Aktivität eignet.

# 1 Einleitung

---

## 1.1 Mechanismen molekularer Evolution

Erste Beschreibungen eines evolutionären Prozesses zur Entstehung des Lebens reichen auf den im 6. Jahrhundert vor Christus lebenden griechischen Philosophen Anaximandros von Milet zurück (Osborn, 1905). Er vertrat die Ansicht, dass die ersten Lebewesen aus dem Wasser hervorgegangen sind und der Mensch sich aus Fischen entwickelt habe. Unser heutiges Bild von der Entstehung der Arten wurde durch Charles Darwin in seinem 1859 erschienen Buch *The Origin of Species* maßgeblich geprägt. Darin formuliert er die Bedeutung seiner Erkenntnisse im letzten Satz des Buches:

*“There is grandeur in this view of life, with its several powers, having been originally breathed into a few forms or into one; and that [...] from so simple a beginning endless forms most beautiful and most wonderful have been, and are being, evolved.” (Darwin, 1859)*

Etwa 150 Jahre nach Charles Darwin wird die „Evolution“ als wichtigster Begriff der gesamten Biologie angesehen (Mayr, 2003) und dank neuer Methoden seit Mitte des 20. Jahrhunderts zusehends auch auf molekularer Ebene analysiert. Von großem Interesse sind dabei die Anfänge des Evolutionsprozesses vor rund 3,8 Milliarden Jahren (Nisbet & Sleep, 2001). Weitgehend anerkannt ist, dass sich aus einem letzten gemeinsamen Vorfahren (LUCA = *last universal common ancestor*) die drei Domänen des Lebens – Bacteria, Archaea und Eucarya – entwickelt haben (Woese & Fox, 1977; Woese *et al.*, 1990). Dabei wirft die Komplexität und Vielseitigkeit heutiger Organismen und deren Biosynthesewege die Frage auf, wie aus den geschätzten 20–100 Enzymen des LUCA die mehr als 1000 spezialisierten Enzyme eines Bakteriums wie *Escherichia coli* hervorgegangen sind (Lazcano & Miller, 1996, 1999; Ycas, 1974; Jensen, 1976; Schmidt *et al.*, 2003).

Denkbare und mittlerweile anerkannte Möglichkeiten, welche die Ausweitung metabolischer Vielfalt ermöglichen, sind horizontaler Gentransfer und Genduplikation. Beim horizontalen Gentransfer werden Gene und somit die dadurch kodierten Proteine zwischen Organismen ausgetauscht (Ochmann *et al.*, 2000, Jain *et al.*, 2002, 2003). Man schätzt, dass *E. coli* etwa 10–15 % seiner Gene durch

horizontalen Gentransfer erworben hat (Huynen & Bork, 1998). Im Vergleich dazu dürften jedoch Genduplikation und anschließende Diversifikation eine noch größere Bedeutung für die molekulare Evolution haben, da die Entstehung von etwa 50 % aller Gene von Mikroorganismen auf diese Prozesse zurückgeführt werden kann (Fani *et al.*, 1998; Lynch & Conery, 2000).

Nach einer Genduplikation können die beiden Tochterproteine die gleiche Funktion ausüben. Diese Redundanz macht es möglich, dass in einem Gen Mutationen auftauchen, die das kodierte Protein inaktivieren und somit unbrauchbar für den Organismus machen. Alternativ können in einer Genkopie Mutationen auftreten, die dem Organismus einen Selektionsvorteil liefern (Chothia *et al.*, 2003; Lutz & Benkovic, 2002).

Neben der Genduplikation ist die Genfusion als Evolutionsmechanismus von großer Bedeutung (Jensen, 1987, Lang *et al.*, 2000). Durch Genfusion kommt es auf Proteinebene zu einer kovalenten Verknüpfung von Proteindomänen, wodurch die Translations- und Rotationsentropie des entfalteten Zustands verringert und somit eine wechselseitige Stabilisierung erreicht wird (Erickson, 1989; Terwilliger, 1995; Nagi & Regan, 1997). Bei Proteinen, die in Biosynthesewegen aufeinanderfolgende Reaktionen katalysieren, wird die Fusion von Genen zum Schutz labiler Reaktionsintermediate ebenfalls häufig beobachtet (Brilli & Fani, 2004; Yanai *et al.*, 2002). Die Optimierung der Kontaktflächen fusionierter Domänen kann anschließend durch sukzessive Mutationen erfolgen (Marcotte *et al.*, 1999). Außer der Fusion benachbarter Gene können auch nicht-benachbarte Gene durch Rekombination miteinander fusionieren (Höcker *et al.*, 2004; Nikkhah *et al.*, 2006; Sterner & Höcker, 2005; Yadid & Tawfik, 2007), wodurch das Spektrum an evolvierbaren Proteinstrukturen und Proteinfunktionen deutlich erweitert wird (Grishin, 2001; Koonin *et al.*, 2002; Lupas *et al.*, 2001; Ponstingl *et al.*, 2005; Riechmann & Winter, 2006; Söding & Lupas, 2003). Bashton & Chothia (2007) konnten zeigen, dass durch die Rekombination und Fusion von Domänen aus verschiedenen Superfamilien neue Proteinfunktionen entstehen können. Weiterhin ist es kürzlich im Labor gelungen, durch die Kombination und gerichtete Evolution zweier Domänen neue Ligandenbindungsfunktionen zu etablieren (Huang *et al.*, 2008).

Zur Untersuchung der evolutionären Mechanismen Genduplikation, Genfusion und Genrekombination bieten sich symmetrische und aus evolutionärer Sicht früh

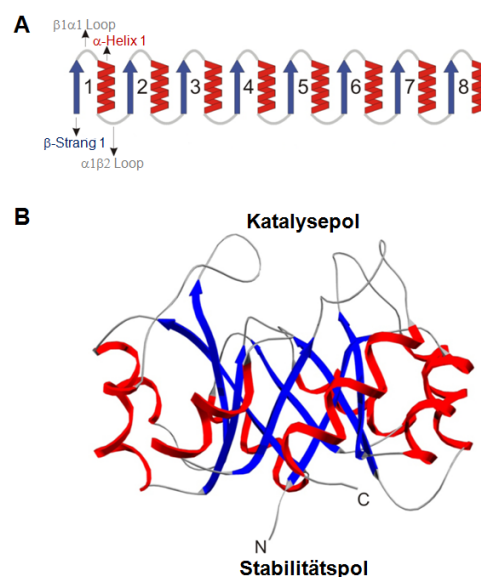
entstandene Proteinstrukturen an. Ein sehr gutes Beispiel dafür ist die  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel*-Struktur (Lang *et al.* 2000; Sterner & Höcker, 2005; Caento-Anollés *et al.*, 2007).

## 1.2 Die $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* Struktur

Die  $(\beta\alpha)_8$ - oder TIM-*Barrel*-Proteinstruktur wurde nach dem ersten Protein benannt, bei dem dieses Strukturmotiv identifiziert wurde, der Triosephosphatisomerase (TIM) aus *Gallus gallus* (Banner *et al.*, 1975, Phillips *et al.*, 1978). Die  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel*-Faltung gehört zu den am häufigsten vorkommenden Faltungstypen bei bisher untersuchten Proteinen. Etwa 10 % aller Proteine mit bekannter Struktur enthalten mindestens eine  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* Domäne (Sterner & Höcker, 2005). In der SCOP-Datenbank (*Structural Classification of Proteins*, Version 1.73, Nov. 2007; Murzin *et al.*, 1995) umfasst die  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* Faltung 33 Superfamilien. Ferner sind  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* Proteine in allen essenziellen Biosynthesewegen zu finden und in allen EC-Klassen mit Ausnahme der Ligasen vertreten (Nagano *et al.*, 2002). Die weite Verbreitung dieser Proteinfaltung deutet darauf hin, dass die  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel*-Faltung neben der P-loop-enthaltenden-Nukleosid-Triphosphat-Hydrolase-Faltung und dem DNA/RNA-bindenden-3-Helix-Bündel zu den ältesten vorkommenden Faltungsmustern zählt (Caento-Anollés *et al.*, 2007).

Für fast alle  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel*-Proteine ist eine enzymatische Aktivität bekannt. Ausnahmen bildet das Speicherprotein Narbonin aus *Vicia narbonensis* L. (Hennig *et al.*, 1992, 1995) und Concanavalin B aus *Canavalia ensiformis* (Hennig *et al.*, 1995). Zu den prominenten Vertretern der  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* Enzyme gehört die bereits erwähnte Triosephosphatisomerase aus der Glykolyse, deren Katalyserate in nichtphysiologischer Reaktionsrichtung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) diffusionskontrolliert ist (Knowles, 1991). Die OMP-Decarboxylase aus der Nukleotidbiosynthese zeichnet sich durch die Beschleunigung der Umwandlung von Orotidin-5'-Monophosphat (OMP) zu Uridinmonophosphat (UMP) um einen Faktor von  $10^{17}$  aus, was dieses Enzym zu dem leistungstärksten aller bekannten Biokatalysatoren macht (Radzicka & Wolfenden, 1995). Schließlich ist die Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase (RuBisCo) zu nennen, welche die  $\text{CO}_2$ -Fixierung im Calvinzyklus der Fotosynthese von Pflanzen katalysiert und das am häufigsten vorkommende Enzym der Biosphäre darstellt (Cooper, 2000).

Ein kanonisches  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* besteht aus mindestens 200 Aminosäuren und setzt sich aus acht Modulen zusammen, die jeweils eine  $\alpha$ -Helix und einen  $\beta$ -Strang enthalten (Sterner & Höcker, 2005). Innerhalb eines Moduls ist der C-Terminus des  $\beta$ -Stranges mit dem N-Terminus der  $\alpha$ -Helix durch einen  $\beta\alpha$ -Loop verknüpft. Die acht Module wiederum sind durch  $\alpha\beta$ -Loops verbunden, welche den C-Terminus der  $\alpha$ -Helix von Modul I mit dem N-Terminus des  $\beta$ -Stranges von Modul I+1 verknüpfen. Dadurch ergibt sich insgesamt eine  $\beta\alpha$ -Supersekundärstruktur (Abbildung 1A). In der Tertiärstruktur lagern sich die acht  $\beta$ -Stränge zu einem parallelen  $\beta$ -Faltblatt zusammen. Dieses zentrale Fass (*Barrel*) hat beispielsweise im Falle der TIM aus *Trypanosoma brucei* einen Durchmesser von 14 Å (Wierenga, 2001). Die acht  $\alpha$ -Helices, welche zumeist amphipatisch sind, umgeben dieses Fass. Sie haben mit ihrer hydrophilen Seite Kontakt zum Lösungsmittel, während sie mit ihrer hydrophoben Seite mit den  $\beta$ -Strängen interagieren (Abbildung 1B).



**Abbildung 1: Die  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* Faltung.**

**A:** Topologische Darstellung der rechtsgängigen  $\beta\alpha$ -Supersekundärstruktur aus acht  $(\beta\alpha)$ -Modulen. In blau sind  $\beta$ -Stränge, in rot  $\alpha$ -Helices und in grau die verbindenden *Loops* dargestellt.

**B:** Seitenansicht eines kanonischen  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* Proteins. Im Zentrum ist das aus acht  $\beta$ -Strängen gebildete Fass zu erkennen, welches von acht  $\alpha$ -Helices umgeben ist. Die katalytisch essenziellen Reste liegen, wie bei allen  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* Enzymen, an den C-terminalen Enden der  $\beta$ -Stränge und in dem darauf folgenden  $\beta\alpha$ -Loops („Katalysepol“). Der restliche Teil der Faltung, inklusive der gegenüberliegenden Seite des Fasses mit den  $\alpha\beta$ -Loops, ist für die konformationelle Stabilität verantwortlich („Stabilitätspol“).

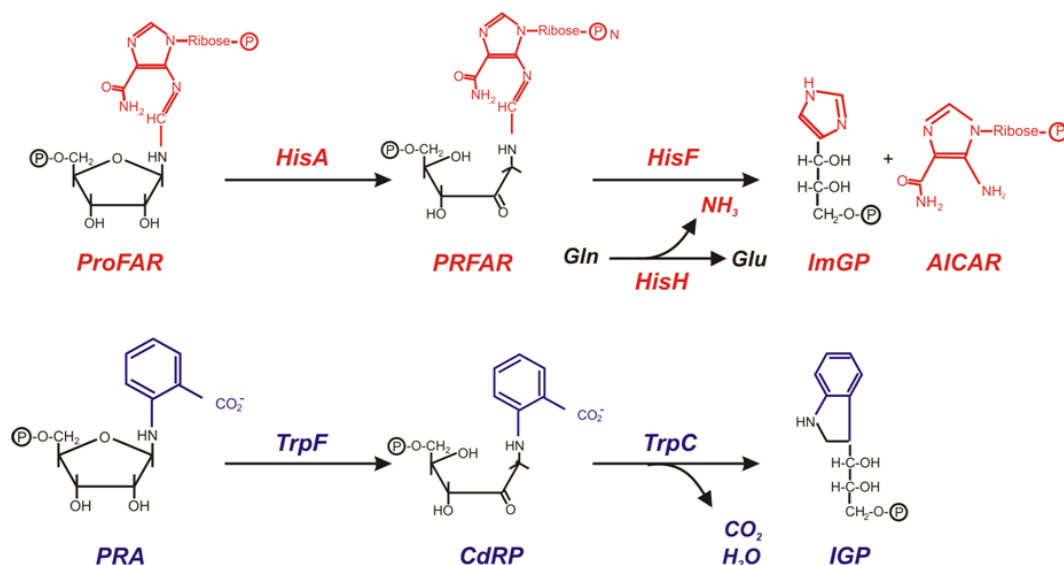
Bei allen  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* Enzymen ist eine Aufgabenteilung in unterschiedliche Bereiche des Proteingerüsts konserviert. So befinden sich die katalytisch essenziellen



Aminosäuren stets an den C-terminalen Enden der  $\beta$ -Stränge bzw. in den  $\beta\alpha$ -Loops. Die  $\alpha\beta$ -Loops sind meist unflexibler und kürzer als die  $\beta\alpha$ -Loops, was wichtig für die konformationelle Stabilität des Proteins ist (Höcker *et al.*, 2001). Dadurch wird zwischen einem Katalysepol und einem Stabilitätspol unterschieden (Abbildung 1B). Somit stellen  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyme ein gutes Strukturgerüst zur Modifizierung katalytischer Aktivitäten dar, da die Reste am Katalysepol ohne Beeinträchtigung der Stabilität des Proteins ausgetauscht werden können. Dies macht die  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Struktur zu einem geeigneten Objekt für das Enzymdesign und könnte auch der Grund dafür sein, weshalb diese Faltung eine so weite Verbreitung in der Natur gefunden hat (Sternier & Höcker, 2005).

### 1.3 Vergleich von $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzymen der Histidin- und Tryptophanbiosynthese

Die  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyme HisA und HisF lieferten nicht nur wichtige Hinweise auf die Evolution der Faltung aus  $(\beta\alpha)_4$ -Halbbarreln (siehe Kapitel 1.4), sondern trugen auch zum Verständnis der Entstehung unterschiedlicher katalytischer Aktivitäten bei. HisA und HisF sowie PRA-Isomerase (TrpF) und IGP-Synthase (TrpC) katalysieren jeweils zwei analoge aufeinanderfolgende Reaktionen in der Biosynthese von Histidin bzw. Tryptophan (Abbildung 2).



**Abbildung 2:**  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyme katalysieren analoge Reaktionen in der Histidin- und Tryptophanbiosynthese.

HisA und TrpF katalysieren Amadori-Umlagerungen von einer Aminoaldose in eine Aminoketose. HisF und TrpC katalysieren die Ringschlussreaktionen, die zu ImGP bzw. IGP führen. Das zweite Produkt der HisF-Reaktion, AICAR, wird in der *de novo* Purin-Biosynthese verwendet. Um ImGP und AICAR

zu bilden, verwendet HisF Ammoniak, das an der Glutaminase HisH durch Desaminierung von Glutamin zu Glutamat gebildet wird (Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001).

Abkürzungen: **AICAR**: 5-Aminoimidazol-4-carboxamid-ribotid; **CdRP**: 1-(o-Carboxyphenylamino)-1-deoxyribulose-5-phosphat; **Gln**: Glutamin; **Glu**: Glutamat; **HisA**: ProFAR-Isomerase; **HisF**: Synthase Untereinheit der ImGP-Synthase; **HisH**: Glutaminase Untereinheit der ImGP-Synthase; **IGP**: Indolglycerinphosphat; **ImGP**: Imidazolglycerinphosphat; **PRA**: Phosphoribosylanthranilat; **PRFAR**: N'-[(5'-phosphoribulosyl)-formimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamid-ribonukleotid; **ProFAR**: N'-[(5'-phosphoribosyl)-formimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamid-ribonukleotid; **TrpC**: IGP-Synthase; **TrpF**: PRA-Isomerase

HisA katalysiert den vierten Schritt in der Histidinbiosynthese, die Amadori-Umlagerung der Aminoaldose ProFAR zur Aminoketose PRFAR (Margolies & Goldberger, 1966). Die anschließende Umwandlung von PRFAR in ImGP und AICAR wird von der ImGP-Synthase katalysiert, welche sich aus einem 1:1 Komplex aus HisF und HisH zusammensetzt (Klem & Davisson, 1993). ImGP wird im Verlauf des Biosyntheseweges weiter zu Histidin umgewandelt, während AICAR in die Purinbiosynthese eingeht. Die zur Superfamilie der Ribulose-Phosphat-bindenden ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>-*Barrel* gehörenden Enzyme HisA und HisF besitzen ca. 25 % identische und ca. 40 % ähnliche Aminosäuren (Thoma *et al.*, 1998). Der Vergleich der Kristallstrukturen der beiden Enzyme aus *T. maritima* liefert einem *rmsd*-Wert für die C $\alpha$ -Atome von nur 1,79 Å (Lang *et al.*, 2000). So findet man an äquivalenten Positionen in der N- und der C-terminalen Hälfte zwei Phosphatbindestellen, die für die Bindung der zweifach phosphorylierten Substrate ProFAR und PRFAR wichtig sind (Thoma *et al.*, 1998). Zusätzlich wurden in beiden Enzymen die gleichen katalytisch essenziellen Reste an äquivalenten Positionen der Struktur identifiziert, jeweils ein Aspartat am C-Terminus von  $\beta$ -Strang 1 (Asp8 in HisA und Asp11 in HisF) und am C-Terminus von  $\beta$ -Strang 5 (Asp127 in HisA und Asp130 in HisF; Henn-Sax *et al.*, 2002; Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001). Der stärkste Hinweis auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung von HisA und HisF ist die Fähigkeit von HisF zur Katalyse der HisA-Reaktion, wenn auch mit einer etwa 10.000-fach geringeren katalytischen Effizienz als HisA selbst. Für diese HisA-Fremdaktivität von HisF sind die gleichen Aspartate 11 und 130 verantwortlich, die auch essenziell für die HisF-Aktivität sind (Lang *et al.*, 2000).

Ein analoges Paar von ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>-*Barrel* Enzymen wie HisA und HisF findet sich in der Tryptophanbiosynthese mit TrpF und TrpC, die den dritten und vierten Schritt der Reaktionskaskade katalysieren. TrpF und TrpC zeigen keine signifikante Sequenzübereinstimmung, bilden jedoch ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>-*Barrel* Strukturen aus, die im Bereich

der Bindestelle für die Phosphatgruppe des jeweiligen Substrats große Ähnlichkeiten aufweisen (Wilmanns *et al.*, 1991).

Vergleicht man HisF und TrpC, so katalysieren beide Enzyme Ringschlussreaktionen zum ImGP bzw. IGP. Die Reaktionsmechanismen sind jedoch verschieden (Darimont *et al.*, 1998; Hennig *et al.*, 2002; Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001), insbesondere weil HisF mit Ammoniak ein zweites Substrat benötigt, welches durch die assoziierte Glutaminase-Untereinheit HisH bereitgestellt wird.

Bei der von TrpF katalysierten Reaktion handelt es sich wie bei der von HisA um eine Amadori-Umlagerung der Aminoaldose PRA zur Aminoketose CdRP. HisA und TrpF unterscheiden sich somit nur in ihrer Substratspezifität, nicht aber in ihrem Reaktionsmechanismus (Henn-Sax *et al.*, 2002). Die für die Katalyse essenziellen Reste von HisA und TrpF aus *T. maritima* liegen an analoger Position: Asp8 aus HisA und Cys7 aus TrpF finden sich an den C-terminalen Enden von  $\beta$ -Strang 1. Der Rest Asp127 und das für die Katalyse wichtige Thr164 aus HisA finden sich an den C-terminalen Enden von  $\beta$ -Strang 5 bzw. 6 und kommen in der Superpositionierung der beiden Röntgenstrukturen in enger räumlicher Nähe zu Asp126 aus TrpF zu liegen, welches am C-terminalen Ende von  $\beta$ -Strang 6 liegt. Die Kristallstruktur von TrpF aus *T. maritima* mit gebundenem Produktanalogon rCdRP (pdb: 1lbm) legt nahe, dass Asp126 als allgemeine Säure die Öffnung des Riboseringes katalysiert und Cys7 als allgemeine Base für die Deprotonierung von C-2' verantwortlich sein könnte (Henn-Sax *et al.*, 2002). Die gleiche Funktionsaufteilung gilt für die katalytisch essenziellen Reste von HisA (Quevillon-Cheruel *et al.*, 2006). Diese Beobachtungen legen nahe, dass HisA und TrpF, ebenso wie HisA und HisF, durch divergente Evolution aus einem gemeinsamen Vorläufer hervorgegangen sind.

Diese Hypothese wird durch eine Reihe weiterer experimenteller Befunde unterstützt. So konnte gezeigt werden, dass der Austausch der katalytisch essenziellen Reste Asp127 in HisA und Asp130 in HisF gegen eine nicht-negativ-geladene Aminosäure zur Etablierung von TrpF-Aktivität auf dem jeweiligen Enzym ausreicht (Jürgens *et al.*, 2000; Leopoldseder *et al.*, 2004). Dagegen ist die zweite katalytisch essenzielle Aminosäure (Asp8 in HisA und Asp11 in HisF) auch notwendig für die TrpF-Aktivität von HisA-D127V und HisF-D130V. In weiteren Arbeiten konnte das zu HisA homologe bifunktionelle  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzym PriA in *Streptomyces coelicolor* und *Mycobacterium tuberculosis* identifiziert werden, welches sowohl die HisA- als auch

die TrpF-Reaktion im jeweiligen Organismus katalysiert (Barona-Gómez & Hodgson, 2003; Kuper *et al.*, 2005; Wright *et al.*, 2008).

#### 1.4 Die Evolution der $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Struktur aus $(\beta\alpha)_4$ -Halbbarreln

Bereits in den 90er Jahren wurde spekuliert, dass die  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Struktur zu einem sehr frühen Zeitpunkt in der Evolution entstanden sein muss (Farber & Petsko, 1990). Durch neue bioinformatische Methoden konnten dafür weitere Hinweise gewonnen werden (Caetano-Anollés *et al.*, 2007). Fani *et al.* (2007) erwägen darüber hinaus, dass die  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyme HisA und HisF aus der Histidinbiosynthese bereits Teil des LUCA waren. Dabei ist bis heute unklar, ob sich die  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Struktur durch konvergente Evolution, also mehrmals unabhängig voneinander, oder durch divergente Evolution nach Genduplikation und Diversifikation aus einem gemeinsamen Vorläufer entwickelt hat. Für die konvergente Evolution sprechen die allgemeinen geringen Sequenzidentitäten (Nagano *et al.*, 2002), die Vielfalt unterschiedlicher Funktionen und katalysierter Reaktionsmechanismen (Anantharaman *et al.*, 2003) sowie die Existenz von  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Proteinen ohne enzymatische Funktion (Hennig *et al.*, 1992, 1995). Hinweise auf eine divergente Evolution von  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Proteinen liefert die konservierte Unterteilung in Katalyse- und Stabilitätspol (Abbildung 1B) und die Ähnlichkeit von Substratbindemotiven von  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzymen, die aufeinander folgende Schritte eines Stoffwechselweges katalysieren (Henn-Sax *et al.*, 2001). Weiterhin konnten  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyme aus verschiedenen Stoffwechselwegen gefunden werden, die denselben Liganden binden können. So stellt z. B. D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat das Substrat der TIM und eines der Produkte der  $\alpha$ -Untereinheit der Tryptophan-Synthase dar (Henn-Sax *et al.*, 2001).

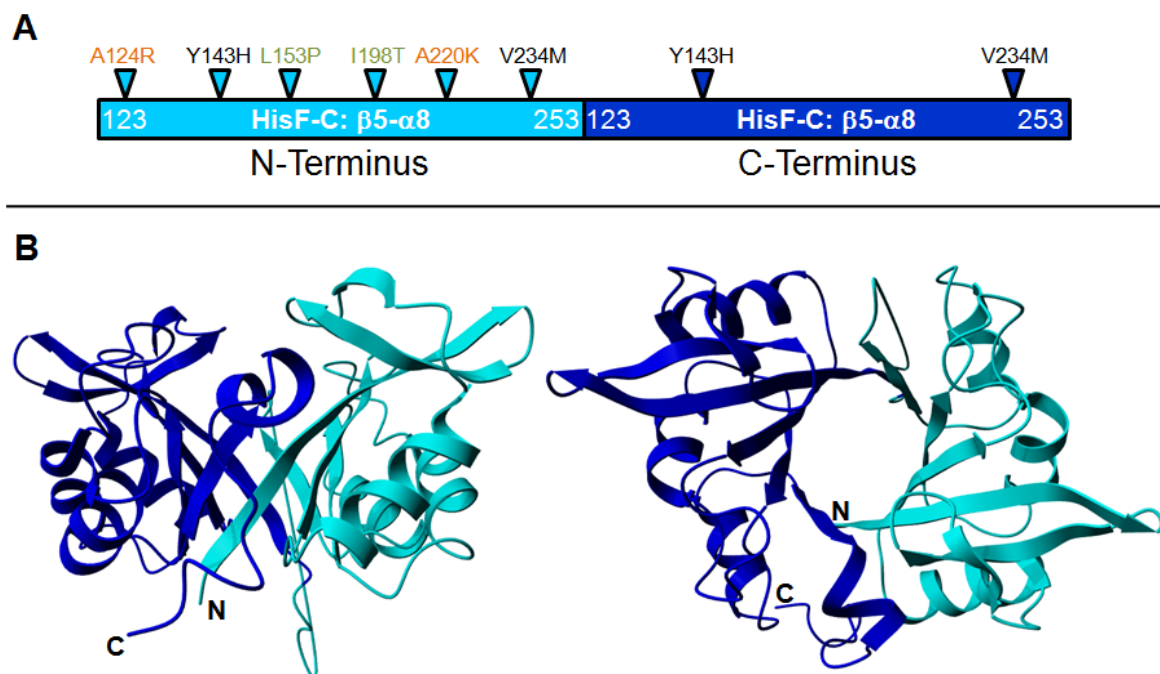
Neben der Frage, nach der konvergenten oder divergenten Evolution und den daraus abgeleiteten Verwandtschaftsbeziehungen von  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Proteinen, wird seit einigen Jahren untersucht, wie sich die  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Struktur entwickelt hat. Zunächst wurde angenommen, dass  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Proteine aus einer einzigen Domäne bestehen. Genauere Analysen der Sequenzen und Strukturen der  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyme ProFAR-Isomerase (HisA) und ImGP-Synthase (HisF; 1.3) ergaben jedoch starke Ähnlichkeiten zwischen den N-terminalen Hälften ( $\beta\alpha$ -Module 1–4; HisA-N

bzw. HisF-N) und den C-terminalen Hälften ( $\beta\alpha$ -Module 5–8; HisA-C bzw. HisF-C). Strukturbasierte Sequenzalignments von HisA-N, HisF-N und HisA-C und HisF-C aus *Thermotoga maritima* ergaben Sequenzidentitäten zwischen 15 % und 26 %, bei *rmsd*-Werten der C $\alpha$ -Atome zwischen 1,55 und 2,10 Å (Lang *et al.*, 2000; Söding *et al.*, 2006). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die einzeln hergestellten Halbbarrels von HisF (HisF-N & HisF-C) definierte Sekundär- und Tertiärstrukturen ausbilden. Nach Co-Expression *in vivo* oder gemeinsamer Rückfaltung *in vitro* sind sie sogar in der Lage, sich zu einem funktionellen Homodimer mit nativer HisF-Aktivität zusammenzulagern, was Implikationen für einen 4 + 4 Faltungsmechanismus von HisF liefert (Höcker *et al.*, 2001). Diese Befunde stützen die von Fani *et al.* (1994) aufgestellte Theorie, dass der gemeinsame Vorläufer von HisF und HisA durch Duplikation und Fusion eines ( $\beta\alpha$ )<sub>4</sub>-Halbbarrel Proteins entstanden ist und belegen, dass zumindest diese beiden ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>-Barrel Enzyme aus zwei Domänen bestehen. Diese Theorie wurde kürzlich um ein Evolutionsmodell für HisA und HisF erweitert, wonach sich HisA aus einer ( $\beta\alpha$ )<sub>4</sub>-Halbbarrel-Domäne durch Genduplikation und anschließende Fusion entwickelt hat und daraus durch eine weitere Duplikation das *hisF*-Gen hervorgegangen ist (Fani *et al.*, 2007). Unterstützt wird diese Theorie dadurch, dass HisF schwache HisA-Aktivität zeigt (Lang *et al.*, 2000:1.3). Weiter wird spekuliert, dass die (S)-3-O-Geranylgeranyl-glycerolphosphat-Synthase (GGGPS) aus *Archaeoglobus fulgidus*, welche in die Membranlipidsynthese von Archaeen involviert ist, ebenfalls aus einem ( $\beta\alpha$ )<sub>4</sub>-Halbbarrel-Vorläuferprotein, oder durch Duplikation eines frühen *hisF*-Gens hervorgegangen ist (Payandeh & Pai, 2007). Beispiele für ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>-Barrel Proteine, für die ebenfalls ein 4 + 4 Faltungsmechanismus nachgewiesen werden konnte, und die somit auch aus einem ( $\beta\alpha$ )<sub>4</sub>-Halbbarrel entstanden sein können, sind TrpF und TIM (Soberon *et al.*, 2004; Bertolaet & Knowles, 1995; Pan *et al.*, 2004).

Die Hypothese, dass es sich bei ( $\beta\alpha$ )<sub>4</sub>-Halbbarrel-Proteinen tatsächlich um unabhängig evolvierende Domänen handelt, konnte durch weitere Untersuchungen gestützt werden. So zeigte die NMR-Analyse von Tm0979 aus *T. maritima*, dass dieses Protein unbekannter Funktion aus einer dimerisierten ( $\beta\alpha$ )<sub>4</sub> Einheit besteht (Gaspar *et al.*, 2005). Allerdings erfolgt die Dimerisierung über die außen liegenden Helices, sodass keine Barrel-Struktur gebildet wird.

Um die postulierte Evolution der ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>-Barrel Struktur aus Genduplikation und anschließender Genfusion im Labor nachzuvollziehen, wurde das bereits

beschriebene HisF-C *in tandem* fusioniert (HisF-CC). Die anschließende Optimierung der Kontaktfläche der beiden Hälften führte zum  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Protein HisF-C\*C, das hauptsächlich in monomerer Form vorliegt, aber eine gewisse Tendenz zur Aggregation aufweist (Höcker *et al.*, 2004). Durch gerichtete Evolution von HisF-C\*C wurde HisF-C\*\*C hergestellt, welches deutlich löslicher und stabiler ist und ein reines Monomer bildet (Seitz *et al.*, 2007). HisF-C\*\*C bildete die Grundlage für die Kristallisation des weiter evolvierten Fusionskonstruktes HisF-C\*\*\*C (Abbildung 3) und die anschließende Etablierung katalytischer Aktivität (Lochner, 2008). Somit konnte der postulierte Evolutionsmechanismus eines  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyms in seinen Grundzügen vollständig rekonstruiert werden.



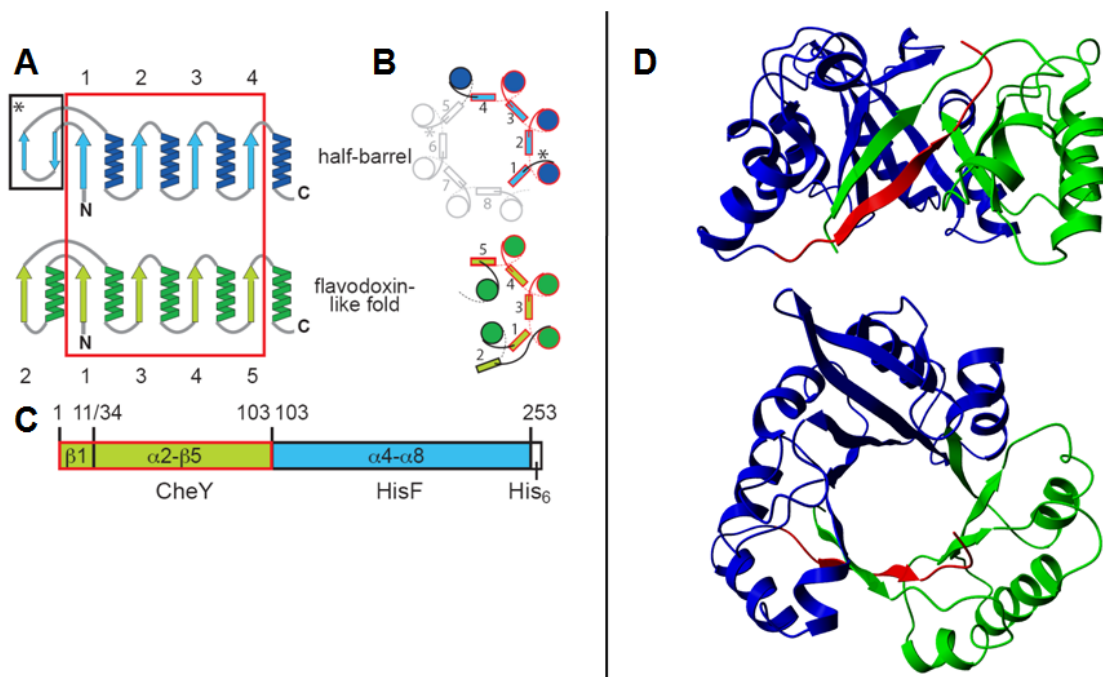
**Abbildung 3: Konstruktion des aus zwei ursprünglich identischen HisF-C Hälften bestehenden  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyms HisF-C\*\*\*C.**

**A:** Schematischer Aufbau von HisF-C\*\*\*C. In hellblau ist der N-Terminus, in dunkelblau der C-Terminus von HisF-C\*\*\*C gezeigt (jeweils bestehend aus den C-terminalen Aminosäuren 123–253 von HisF). Durch rationales Design wurden in der N-terminalen Hälfte die Austausche A124R und A220K eingebracht (HisF-C\*C). Durch gerichtete Evolution wurden die Austausche Y143H und V234M in der N-terminalen Hälfte identifiziert (HisF-C\*\*C). Die Übertragung von Y143H und V234M in die C-terminale Hälfte lieferte HisF-C\*\*\*C. Die durch gerichtete Evolution identifizierten Austausche L153P und I198T führten zur Etablierung von katalytischer Aktivität.

**B:** Kristallstruktur von HisF-C\*\*\*C mit einer Auflösung von 2,0 Å in der Seitenansicht (links) und Aufsicht auf den Katalysepol (rechts). Die Farbcodierung entspricht der aus **A**. Die N- und C-Termini sind markiert. Der *rmsd*-Wert der C $\alpha$ -Atome liegt bei Superpositionierung mit HisF (pdb: 1thf) bei 1,6 Å. Daten aus Lochner (2008).

Dabei reichten lediglich acht Aminosäureaustausche aus, entsprechend 3 % des Proteins, um ein aktives artifizielles  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzym zu konstruieren. Dieses

Ergebnis ist umso bemerkenswerter, wenn man berücksichtigt, dass es sich bei HisF-C um eine Domäne handelt, die Millionen Jahre evolutionäre Drift erlebt hat. Datenbankrecherchen nach Proteinen mit strukturellen Ähnlichkeiten zu HisF-C und HisF-N lieferten Treffer zu mehreren Mitgliedern der Flavodoxin-ähnlichen Faltung (Höcker *et al.*, 2002). Diese tritt isoliert oder als Domäne in größeren Proteinen auf (Murzin *et al.*, 1995) und gehört neben der  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Faltung zu den ältesten Strukturfamilien (Caetano-Anollés, 2007). Flavodoxin-ähnliche Proteine weisen eine  $(\beta\alpha)_5$ -Faltung aus fünf parallelen  $\beta$ -Strängen und fünf  $\alpha$ -Helices auf, die durch *Loops* miteinander verbunden sind. Vier der fünf  $(\beta\alpha)$ -Einheiten entsprechen den vier Einheiten im  $(\beta\alpha)_4$ -Barrel, ein  $(\beta\alpha)$ -Modul entspricht zwei kurzen zusätzlichen  $\beta$ -Strängen in HisA bzw. HisF, welche in den  $\beta\alpha$ -Loops 1 und 5 liegen und ein kurzes antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt bilden (Lang *et al.*, 2000). Kürzlich konnte aus dem  $(\beta\alpha)_4$ -Barrel HisF-C und CheY aus *T. maritima*, welches eine  $(\beta\alpha)_5$ -flavodoxinähnliche Faltung besitzt, ein vollständiges  $(\beta\alpha)$ -Barrel rekonstruiert werden (Bharat *et al.*, 2008). Die Röntgenstrukturanalyse des chimären Proteins ergab eine unerwartete Abweichungen von der kanonischen  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Faltung durch das Auftreten eines zusätzlichen neunten  $\beta$ -Stranges im zentralen Barrel (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Konstruktion einer CheYHisF Chimäre.**

**A:** Topologische Darstellung der  $\beta\alpha$ -Supersekundärstruktur aus vier  $(\beta\alpha)$ -Modulen. Das  $(\beta\alpha)_{1-4}$ -Halb-Barrel von HisF (HisF-N) ist in blau, die Flavodoxin-ähnliche  $(\beta\alpha)_5$ -Faltung ist in grün dargestellt. Superpositionierbare Bereiche befinden sich im roten Kasten. Die Nummerierung bezieht sich auf die  $\beta$ -Stränge.

**B:** Vergleich der Anordnung der Sekundärstrukturelemente im  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* (oben) und in der Flavodoxin-ähnlichen Faltung (unten).  $\alpha$ -Helices sind als Kreise und  $\beta$ -Stränge als Rechtecke dargestellt. Die in **A** mit einem Stern (\*) markierten zusätzlichen  $\beta$ -Stränge wurden der Übersichtlichkeit halber weggelassen. Die Lage ist angedeutet durch einen (\*).

**C:** Konstruktion der CheYHisF Chimäre. In grün sind die Aminosäurepositionen 1–11 ( $\beta 1$ ) und 34–103 ( $\alpha 2$ - $\beta 5$ ) aus CheY dargestellt, in blau sind die Positionen 103–253 aus HisF ( $\alpha 4$ - $\alpha 8$ ) gezeigt.

**D:** Kristallstruktur von CheYHisF mit einer Auflösung von 3,1 Å in der Seitenansicht (oben) und in der Aufsicht auf den Katalysepol (unten; pdb: 3cwo). Der HisF-Teil ist in blau, der CheY-Teil ist in grün gezeigt. Der zusätzliche  $\beta$ -Strang 9 des zentralen Fasses ist in rot dargestellt. Daten aus Bharat *et al.* (2008).

Mit der Konstruktion von CheYHisF ist es erstmals gelungen, die evolutionäre Rekombination zweier  $(\beta\alpha)_4$ - bzw.  $(\beta\alpha)_5$ -Domänen im Labor nachzuvollziehen. Die Phosphoinositid-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) stellt dagegen ein natürlich vorkommendes  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* Protein dar, welches vermutlich durch die Rekombination von  $(\beta\alpha)_4$ -*Barrel* Hälften entstanden ist (Heinz *et al.*, 1998).

## 1.5 Konstruktion chimärer Proteine aus HisA und HisF

In bisherigen Arbeiten konnte die postulierte Evolution von  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* Proteinen mittels Duplikation und Fusion von  $(\beta\alpha)_4$ -Halb*barrels* am Beispiel der Generierung von HisF-C\*\*\*C aus HisF-C im Labor rekonstruiert werden (1.4; Abbildung 3). Die Eigenschaften der stabilen CheYHisF-Chimäre (1.4; Abbildung 4) lassen es daneben als wahrscheinlich erscheinen, dass die Rekombination von  $(\beta\alpha)_4$ -Halb*barrels* zu  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrels* mit neuen Eigenschaften führen könnte und somit einen zusätzlichen evolutionären Mechanismus der strukturellen und funktionellen Diversifizierung darstellt.

Zwischen den beiden  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* Enzymen HisA und HisF bestehen signifikante Ähnlichkeiten in Struktur und Funktion (1.3). Außerdem findet sich in beiden Proteinen eine offensichtliche zweifache Symmetrie (1.4). Diese Beobachtungen haben HisA und HisF als geeignete Kandidaten erscheinen lassen, um im Rahmen dieser Arbeit die postulierte Rekombination von  $(\beta\alpha)_4$ -Halb*barrel* Proteinen näher zu untersuchen. Dazu wurden zwei Chimären von HisA und HisF hergestellt. Im ersten Fall wurde die N-terminale Hälfte von HisA mit der C-terminalen Hälfte von HisF fusioniert (HisAF). Bei der zweiten Chimäre ist die N-terminale Hälfte von HisF mit der C-terminalen Hälfte von HisA fusioniert (HisFA).

Die biophysikalische Charakterisierung von HisAF und HisFA war zu Beginn dieser Arbeit abgeschlossen (Höcker *et al.*, 2004). Beide Proteine liegen nach heterologer



Expression in unlöslicher Form in *E. coli* vor und zeigen nach Rückfaltung und Aufreinigung keine katalytische Aktivität. Rekombinant hergestelltes HisAF bildet ein monomeres Protein mit definierten Sekundär- und Tertiärstrukturen, die vermutlich denen der entsprechenden Bereiche der Elternenzyme HisA und HisF ähneln. HisFA hingegen bildet hochmolekulare Aggregate mit weit weniger gut definierten Strukturelementen.

## 1.6 Rationales Design *versus* gerichtete Evolution

Zur Verbesserung bzw. Veränderung der Stabilität oder der Funktion von Proteinen stehen grundsätzlich zwei verschiedene Techniken zur Verfügung, rationales Design und gerichtete Evolution (Arnold, 2001; Bornscheuer & Pohl, 2001; Chen, 2001).

Beim rationalen Design werden detaillierte Informationen hinsichtlich der Struktur und der katalysierten Reaktion genutzt. So können Proteine hinsichtlich ihrer Stabilitätseigenschaften durch das Nachahmen vorhandener Muster verbessert werden (Höcker *et al.*, 2004). Weiterhin ist es möglich, Proteine mesophiler Organismen durch das Übertragen entsprechender Reste aus homologen Proteinen hyperthermophiler Organismen zu stabilisieren (Sternier & Liebl, 2001, Littlechild *et al.*, 2007). Auch gelang es mittels rationalem Design neue katalytische Aktivitäten auf bestehenden Proteingerüsten zu etablieren bzw. zu verändern (Woycechowsky *et al.*, 2007; Toscano *et al.*, 2007; Cedrone *et al.*, 2000). Eine zusätzliche Herausforderung stellt das *de novo* Design von neuen Enzymfunktionen dar. Neben strukturellen Informationen müssen hier zusätzlich die für die Katalyse essenziellen Reste identifiziert und der Katalysemechanismus sehr genau bekannt sein. So ermöglichte ein computerbasiertes Proteindesign die Modifizierung des Thioredoxin-Gerüsts zur Katalyse einer Esterhydrolyse (Bolon & Mayo, 2001). Zusätzlich wurde kürzlich auf  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* Gerüsten eine in der Natur nicht vorkommende Retro-Aldol Reaktion und eine Kemp Eliminierung etabliert (Jiang *et al.*, 2008; Röthlisberger *et al.*, 2008).

Das Anwendungsgebiet der gerichteten Evolution fokussiert sich meist ebenfalls auf die Stabilisierung von Proteinen (Seitz *et al.*, 2007) und die Etablierung bzw. Umwandlung von Enzymfunktionen (Jürgens *et al.*, 2000; Seelig & Szostak, 2007). Anders als beim rationalen Design werden hier zufällige Mutationen in das Gen eingebracht und anschließend durch ein geeignetes Selektions- bzw. *Screening*-Verfahren nach Varianten mit den gewünschten Eigenschaften gesucht (Aharoni *et*

*al.*, 2005; Boersma *et al.*, 2007). Neben der klassischen Zufallsmutagenese durch *error-prone* PCR (*ep*PCR, fehlerbehaftete PCR; Cadwell & Joyce, 1994), kommen Methoden wie DNA-*Shuffling* (Stemmer, 1994), StEP (*Staggered Extension Process*; Zhao *et al.*, 1998) oder ITCHY (*Incremental Truncation for the Creation of Hybrid Proteins*; Ostermeier *et al.*, 1999) zum Einsatz.

Ob rationales Design oder gerichtete Evolution zur Verbesserung biophysikalischer Eigenschaften verwendet wird, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Für das rationale Design müssen ausreichend Informationen vorliegen, um zuverlässige Vorhersagen treffen zu können. Um gerichtete Evolution durchführen zu können, muss dagegen ein zuverlässiges Selektions- oder *Screening*-System verfügbar sein.

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Rekombination von  $(\beta\alpha)_4$ -Halbbarrel-Proteinen mit den von HisA und HisF abgeleiteten Chimären HisAF und HisFA im Labor nachvollzogen werden. Dazu wurden mehrere Ansätze verfolgt:

- Verbesserung der Stabilität und Löslichkeit von HisAF und HisFA durch rationales Design und gerichtete Evolution, um eine kristallisierbare Variante zu erhalten.
- Röntgenstrukturanalyse der optimierten HisAF oder HisFA Variante, um Informationen zur Etablierung katalytischer Aktivität zu erhalten.
- Etablierung katalytischer Aktivität auf HisAF durch rationales Design oder gerichtete Evolution.
- Etablierung einer Protein-Protein-Interaktion zwischen HisAF und HisH, dem Interaktionspartner von HisF.

Die erwarteten Ergebnisse sollten neue Erkenntnisse bezüglich der Bedeutung der Rekombination von  $(\beta\alpha)_4$ -Modulen bei der Evolution stabiler und funktionsfähiger  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyme liefern.

## 2 Material

---

### 2.1 Bakterien- und Hefestämme

#### Klonierungsstämme

***E. coli* DH5 $\alpha$**  (Hanahan, 1983)

F<sup>-</sup>, *endA1*, *hsdR17* (*r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>-</sup>*), *supE44*, *thi1*, *recA1*, *gyrA* (Nal<sup>r</sup>), *relA1*,  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169,  $\Phi$ 80, *lacZ* $\Delta$ M15

***E. coli* 5 $\alpha$**  (NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt am Main)

*fhuA2*,  $\Delta$ (*argF-lacZ*)U169, *phoA*, *glnV44*,  $\Phi$ 80,  $\Delta$ (*lacZ*)M15, *gyrA96*, *recA1*, *relA1*, *endA1*, *thi-1*, *hsdR17*

Bei diesen Zellen handelt es sich um ein *E. coli* DH5 $\alpha$  Derivat. Durch die Deletion des Gens *fhuA2* fehlt der Eisen-Hydroxamat-Aufnahme-Rezeptor auf der Zelloberfläche, was verhindert, dass der Bacteriophage T1, der an diesen Rezeptor bindet, die Zellen befällt. Somit sind diese Zellen T1-phagenresistent.

***E. coli* Turbo** (NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt am Main)

F', *proA*<sup>+</sup>*B*<sup>+</sup>, *lacI*<sup>q</sup>,  $\Delta$ (*lacZ*)M15/*fhuA2*,  $\Delta$ (*lac-proAB*), *glnV*, *gal* R(*zgb-210::Tn10*), Tet<sup>s</sup>, *endA1*, *thi-1*,  $\Delta$ (*hsdS-mcrB*)5

*E. coli* Turbo Zellen sind wie *E. coli* 5 $\alpha$ -Zellen T1-phagenresistent. Diese Resistenz ist mit einem langsameren Zellwachstum verbunden. Dieser Nachteil wird bei *E. coli* Turbo Zellen kompensiert, wodurch sie innerhalb von 8 h bei Inkubation bei 37 °C sichtbare Kolonien bilden können.

***E. coli* XL1 Blue MRF'** (Stratagene)

$\Delta$ (*mcrA*)183,  $\Delta$ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA*, *lac* [F' *proAB lacI*<sup>q</sup> $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]

In XL1 Blue MRF' Zellen sind alle in *E. coli* K12 bekannten Restriktionsendonucleasen auf Genomebene inaktiviert.

## Expressionsstämme

***E. coli* KK8 = W3110trpEA2** (Schneider *et al.*, 1981)

*trpR*, *tna2*,  $\Delta trpEA2$

***E. coli* BL21(DE3)** (Studier & Moffatt, 1986)

B<sup>-</sup> F<sup>-</sup> *ompT hsdS* (*r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>*) *dcm<sup>+</sup> gal*  $\lambda$ (DE3)

Diese Zellen tragen auf ihrem Chromosom das Gen für die T7 RNA-Polymerase, die zur Genexpression im pET-System verwendet wird.

***E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)** (STRATAGENE, La Jolla, USA)

B<sup>-</sup> F<sup>-</sup> *ompT hsdS* (*r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>*) *dcm<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> gal*  $\lambda$ (DE3) *endA Hte*

- RP-Stamm: [*argU proL* Cam<sup>r</sup>]

- RIL-Stamm: [*argU ileY leuW* Cam<sup>r</sup>]

- RIPL-Stamm: [*argU proL* Cam<sup>r</sup>] [*argU ileY leuW* Strep/Spec<sup>r</sup>]

BL21 CodonPlus (DE3) RP Zellen enthalten auf einem pACYC-basierten Plasmid Gene für die tRNAs *argU* und *proL*. Dieser Expressionsstamm erlaubt dadurch die effiziente Expression von Genen, die die in *E. coli* seltenen Codone AGA und AGG für Arginin und CCC für Prolin enthalten. BL21 CodonPlus (DE3) RIL Zellen enthalten auf einem pACYC-basierten Plasmid Gene für die tRNAs *argU*, *ileY* und *leuW*. Dieser Expressionsstamm erlaubt dadurch die effiziente Expression von Genen, die die in *E. coli* seltenen Codone AGA und AGG für Arginin, AUA für Isoleucin und CUA für Leucin enthalten. BL21 CodonPlus (DE3) RIPL Zellen enthalten auf einem pACYC-basierten Plasmid Gene für die tRNAs *argU* und *proL* sowie auf dem pACYC-kompatiblen Plasmid pSC101 Gene für die tRNAs *argU*, *ileY* und *leuW*. Dieser Expressionsstamm erlaubt dadurch die effiziente Expression von Genen, die die in *E. coli* seltenen Codone, welche für die RP- und RIL-Stämme bereits genannt wurden, enthalten. Das pACYC-Plasmid enthält zusätzlich das Gen für die Chloramphenicolacetyltransferase, die Resistenz gegen Chloramphenicol vermittelt. Das pSC101-Plasmid vermittelt zusätzlich Resistenz gegen Streptomycin und Spectinomycin.

***E. coli* Rosetta(DE3)pLysS** (NOVAGEN/MERCK, Darmstadt)

$F^-$  *ompT hsdS*( $r_B^- m_B^-$ ) *dcm*<sup>+</sup> *Tet*<sup>r</sup> *gal*  $\lambda$ (DE3) *endA* *Hte* [*argU argW glyT ileX leuW metT proL thrT thrU tyrU* Cam<sup>r</sup>]

*E. coli* Rosetta(DE3)pLysS Zellen enthalten auf einem pACYC-basierten Plasmid (pRARE) Gene für die tRNAs *argU*, *argW*, *glyT*, *ileX*, *leuW*, *metT*, *proL*, *thrT*, *thrU*, und *tyrU*. Dieser Expressionsstamm erlaubt somit die effiziente Expression von Genen, die die in *E. coli* seltenen Codone AGA, AGG und CGA für Arginin, GGA für Glycin, AUA für Isoleucin, CUA für Leucin, ACC und ACA für Threonin, TAC für Tyrosin und CCC für Prolin enthalten. Das Plasmid vermittelt zusätzlich Resistenz gegen Chloramphenicol.

***E. coli* T7 Express** (NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt am Main)

*fhuA2 lacZ::T7gene1 lon ompT gal sulA11 dcm* R(*zgb-210::Tn10--Tet*<sup>S</sup>) *endA1*  $\Delta$ (*mcrC-mrr*)114::IS10 R(*mcr-73::miniTn10--Tet*<sup>S</sup>)2

Bei diesen Zellen handelt es sich um ein *E. coli* BL21(DE3) Derivat. Durch die Deletion des Gens *fhuA2* fehlt der Eisen-Hydroxamat-Aufnahme-Rezeptor, wodurch diese Zellen resistent gegen den Bacteriophagen T1 sind. Zusätzlich enthalten die Zellen eine Tetrazyklinresistenz.

***E. coli* T7 Express Rosetta** (Lehrstuhl Sterner)

*fhuA2 lacZ::T7gene1 lon ompT gal sulA11 dcm* R(*zgb-210::Tn10--Tet*<sup>S</sup>) *endA1*  $\Delta$ (*mcrC-mrr*)114::IS10 R(*mcr-73::miniTn10--Tet*<sup>S</sup>)2 [*argU argW glyT ileX, leuW metT proL thrT thrU tyrU* Cam<sup>r</sup>]

Diese Expressionszellen wurden hier am Lehrstuhl hergestellt. Es handelt sich um *E. coli* T7 Express Zellen, die zusätzlich das pRARE Plasmid aus *E. coli* Rosetta(DE)3pLysS enthalten, wodurch die Expression von Genen mit seltenen Codonen in einem T1-phagenresistenten *E. coli* Stamm ermöglicht wird. Neben der Tetrazyklinresistenz erhalten die Zellen durch das pRARE-Plasmid zusätzlich eine Chloramphenicolresistenz.

***E. coli* JM101** (Yanish-Perron *et al.*, 1985)

$F^-$  *traD36 proAB lacI*<sup>q</sup>  $\Delta$ (*lacZ*)M15/ $\Delta$ (*lac-proAB*) *supE glnV thi1*

JM101 Zellen besitzen die tRNA *supE*, wodurch TAG codierte Stoppcodone (*amber*) überlesen werden und stattdessen ein Glutaminrest in die translatierte Polypeptidkette eingebaut wird.

## Deletionsstämme

***E. coli* HfrG6** ( $\Delta hisA$ , Matney *et al.*, 1964)

$\lambda^- hisA323$  (stable)

***E. coli* UTH860** ( $\Delta hisF$ , Goldschmidt *et al.*, 1970)

*ara-14 glnV44* (AS) *galK2*  $\lambda^- hisF860$  (stable) *rpsL145* (strR) *malT1* ( $\lambda^+$ ) *xylA5 mtl-1*

***E. coli* JMB9**  $r^-m^+ \Delta trpF$  (Sternier *et al.*, 1995)

*thr1, leu6, thi1, supE44, galKa, ara14, xyl5, mtl1*, ( $mal^+ \lambda^s$ )

Hierbei handelt es sich um ein Derivat von *E. coli* JMB9.

***E. coli* BW25113** (Datsenko & Wanner, 2000)

$\Delta(araD-araB)567$ ,  $\Delta lacZ4787(::rrnB-3)$ , *lacI*p-4000(*lacI*<sup>Q</sup>),  $\lambda^-$ , *rph-1*,  $\Delta(rhaD-rhaB)568$ , *hsdR514*

Aus der *Knockout*-Bank KEIO (Baba *et al.*, 2006) wurde  $\Delta hisA$  (JW2006) und  $\Delta hisF$  (JW2007) bezogen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nach dem Protokoll von Datsenko & Wanner (2000) ausgehend von *E. coli* BW25113 folgende Deletionsstämme hergestellt:

$\Delta hisA$  (*hisA*, welches sich zwischen *hisH* und *hisF* befindet, wurde vollständig entfernt)

$\Delta hisF$  (*hisF*, welches sich zwischen *hisA* und *hisI* befindet, wurde vollständig entfernt)

$\Delta hisA \Delta hisF$  (*hisA* und *hisF* wurden vollständig entfernt)

Von Thomas Schwab, Lehrstuhl Sternier, wurde in gleicher Weise ein  $\Delta trpC$  Deletionsstamm hergestellt, der freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde.

## Hefestamm zum Testen von Protein-Protein-Interaktionen

**S. cerevisiae AH109** (CLONTECH; James *et al.*, 1996)

MAT $\alpha$ , trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 $\Delta$ , gal80 $\Delta$ , LYS2::GAL1-His3, GAL2-ADE2, met2::GAL7-lacZ

Dieser Hefestamm ist auxotroph für die Biosynthese von Tryptophan, Leucin, Histidin und Adenin. Die Reportergene stehen unter Kontrolle des GAL4 Transkriptionsfaktors (3.2.13).

## **2.2 Vektoren**

### **2.2.1 pET-Vektoren**

Gene, die in die multiple Klonierungsstelle (MCS) von pET-Vektoren (NOVAGEN, *plasmid for expression by T7 RNA Polymerase*) eingefügt wurden, werden durch die RNA-Polymerase des Phagen T7 (Studier *et al.*, 1990) transkribiert. Die Expression der Gene erfolgt in speziellen *E. coli* Stämmen, die eine chromosomale Kopie der T7 RNA-Polymerase besitzen. Die Expression des T7 RNA-Polymerasegens erfolgt unter der Kontrolle eines *lacUV5*-Promotor-Operators und wird durch die Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) induziert. Das zur Unterdrückung der Expression erforderliche Gen für den *lac*-Repressor (*lacI*) liegt auf dem Plasmid und wird konstitutiv exprimiert.

#### pET15b

Im Vektor pET15b befinden sich stromaufwärts von der multiplen Klonierungsstelle sechs Histidin-Codone, gefolgt von der kodierenden Sequenz für die Schnittstelle der Protease Thrombin. Das hergestellte Protein trägt somit N-terminal einen Hexahistidin-*Tag* ((His)<sub>6</sub>-*Tag*), welcher nach Aufreinigung des Proteins über Nickel-Chelat-Affinitätschromatografie proteolytisch abgespalten werden kann. Der Vektor pET15b enthält die kodierende Sequenz für die  $\beta$ -Lactamase (*bla*), wodurch auf Ampicillin-Resistenz selektiert werden kann.

#### pET21a(+) & pET24a(+)

Die pET21a(+)- und pET24a(+)-Vektoren sind so konstruiert, dass unmittelbar stromabwärts der multiplen Klonierungsstelle sechs Histidin-Codone liegen. Das

hergestellte Protein trägt dadurch C-terminal einen (His)<sub>6</sub>-Tag, der eine Aufreinigung durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatografie ermöglicht.

Nach Transformationen mit dem pET21a(+)-Vektor kann mittels der enthaltenen Ampicillin-Resistenz (*bla*) auf plasmidenthaltende *E. coli* Zellen selektiert werden. Im Falle von pET24a(+)-Vektoren erfolgt die Selektion über eine Kanamycin-Resistenz (*kan*). Beide Vektoren sind mit Ausnahme der ausgebildeten Resistenz identisch.

### pETDuet-1

Der pETDuet-1-Vektor wurde zur Koexpression von zwei Genen konstruiert. Dazu enthält der Vektor zwei multiple Klonierungsstellen (MCS). Durch entsprechende Wahl der Restriktionsenzyme kann das Protein, dessen Gen in der ersten MCS kloniert vorliegt, mit einem N-terminalen (His)<sub>6</sub>-Tag versehen werden. Die MCS 1 besteht aus den Erkennungssequenzen für folgende Restriktionsenzyme: *NcoI*, *BamHI*, *SacI*, *Ascl*, *PstI*, *Sall*, *HindIII*, *NotI* und *AflI*. Die erfolgreiche Klonierung in die MCS 1 kann mittels PCR über die Primerkombination 5'pET *Upstream* und 3'Duet *Down* 1 überprüft werden. Die MCS 2 besteht aus den Erkennungssequenzen folgender Restriktionsenzyme: *NdeI*, *BglII*, *EcoRV*, *SgfI*, *AatII*, *KpnI*, *XhoI*, *PacI* und *AvrII*. Die erfolgreiche Klonierung in die MCS 2 kann mittels PCR über die Primerkombination 5'Duet Up 2 und 3'T7 Terminator überprüft werden. Auf plasmidenthaltende *E. coli* Zellen wird mittels der enthaltenen Ampicillin-Resistenz (*bla*) selektiert.

Der Vektor wurde freundlicherweise von Prof. Frank Raushel (Texas A&M University, College Station, USA) zur Verfügung gestellt.

### **2.2.2 pER-Vektoren**

pER-Vektoren basieren auf dem pET24a(+)-Vektor, dessen multiple Klonierungsstelle auf zwei Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *NdeI* und *NotI* reduziert wurde. Zwischen den beiden Schnittstellen wurden Stoppcodone eingebracht, die jedes der drei möglichen Leseraster abdecken. Zusätzlich kommt es aufgrund einer Deletion zwischen den beiden Restriktionsschnittstellen zu einer Leserasterverschiebung. Diese Deletion wird beim Einfügen des jeweiligen Zielgens durch eine zusätzliche Base zwischen dem Ende des Gens und der Restriktionsschnittstelle kompensiert (im Rahmen dieser Arbeit wurde am 3'Ende der verwendeten Gene ein Guanin eingefügt). Dadurch erfolgt eine Synchronisation des

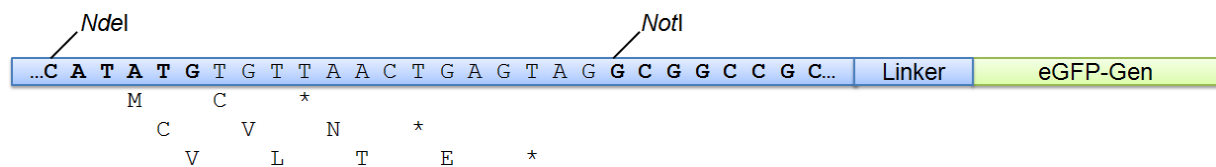


Leserasters des Zielgens mit dem eGFP-Gen (*enhanced Green Fluorescent Protein*), das der hinteren Schnittstelle folgt. Durch die Stoppcodone und die eingefügte Deletion soll die Expression von eGFP ohne eingefügtes Gen verhindert werden.

Die pER-Vektoren wurden von Dr. Ralf Thoma (ROCHE, Basel) konstruiert und zur Verfügung gestellt.

### pER13a & pER13b Vektor

Im pER13a-Vektor (6003 bp) folgt auf die *NotI*-Schnittstelle eine für zehn Aminosäuren kodierende Linkerregion (Waldo *et al.*, 1999) und anschließend das Gen für eGFP (Abbildung 5). Die Fluoreszenz von eGFP wird nicht wie die von GFP bei 396 nm angeregt, sondern bei 488 nm, was der verwendeten Wellenlänge des emittierten Lichts des Argonlasers im FACS entspricht.



#### **Abbildung 5: Multiple Klonierungsstelle und 3'-seitig angrenzender Bereich von pER13a.**

Gezeigt ist der Abschnitt von der Schnittstelle für *NdeI* bis zum eGFP-Gen. Die Aminosäuresequenz jedes Leserasters beginnend beim ATG der *NdeI*-Schnittstelle ist bis zum jeweiligen Stoppcodon unterhalb der DNA-Sequenz gezeigt. Die Linkerregion und das nachfolgende eGFP-Gen sind schematisch dargestellt.

Der pER13b-Vektor (6062 bp) entspricht im Aufbau und in der Funktion dem pER13a-Vektor mit dem Unterschied, dass vor der *NdeI*-Schnittstelle eine *NcoI*-Schnittstelle und ein (His)<sub>6</sub>-Tag eingefügt wurde.

Im Falle von beiden Vektoren erfolgt die Selektion über eine Kanamycin-Resistenz (*kan*).

### pER14a

Der pER14a-Vektor ist in gleicher Weise konstruiert wie der pER13a-Vektor. An die *NotI*-Schnittstelle schließt sich jedoch ohne Linkerregion ein (His)<sub>6</sub>-Tag an. Dieser Vektor dient dazu, Gene aus dem pER13a-Vektor über einen *NdeI/NotI*-Restriktionsverdau ohne das eGFP-Gen umzuklonieren. Anschließend kann die Reinigung des exprimierten Genprodukts über Nickel-Chelat-Affinitätschromatografie erfolgen. Die Selektion erfolgt bei diesem Vektor ebenfalls über eine Kanamycin-Resistenz (*kan*).

### 2.2.3 pMal-c2

Bei dem Vektor pMAL-c2 (NEW ENGLAND BIOLABS, di Guan *et al.*, 1988) wird das klonierte Gen stromabwärts von *malE* in eine Polylinker-Region eingesetzt, was zur Expression eines Fusionsproteins mit dem Maltose-Binde-Protein (MBP) aus *E. coli* führt. Durch den starken IPTG-induzierbaren Promotor  $P_{tac}$  wird eine hohe Expressionsrate gewährleistet. Das *lacI*-Gen für den *lac*-Repressor liegt ebenfalls auf dem Vektor. Das Fusionsprotein kann durch die hohe Affinität von MBP für Maltose mit einer Amylose-Säule aufgereinigt werden. Unmittelbar stromaufwärts der Polylinkerregion von pMAL-c2 liegt die Erkennungssequenz für die spezifische Protease Faktor Xa, wodurch nach der Aufreinigung das MBP vom Zielprotein abgespalten werden kann. Ein erfolgreich kloniertes Gen unterbricht das stromabwärts von *malE* liegende *lacZ $\alpha$* , wodurch positiv transformierte Klone eines  $\alpha$ -Komplementationsstammes (z. B. JM107) auf X-Gal-Platten weiß statt blau erscheinen. Als Selektionsmarker enthält pMAL-c2 die kodierende Sequenz für die  $\beta$ -Lactamase (*bla*), welche transformierten Zellen eine Ampicillin-Resistenz verleiht.

### 2.2.4 pQE-Vektoren

Die kommerziellen pQE-Expressionsplasmide (QIAGEN) gehören zur pDS-Plasmidfamilie (Bujard *et al.*, 1987) und basieren im Gegensatz zu pET-Plasmiden auf einem T5-Promotor Transkriptions-Translationssystem. Das Promotor/Operator-Element besteht aus einem Phagen T5-Promotor und zwei *lac*-Operator-Sequenzen, welche die Wahrscheinlichkeit der *lac*-Repressor-Bindung erhöhen und so die Repression des leistungsstarken T5-Promotors garantieren. Dieser wird von der *E. coli*-eigenen RNA-Polymerase erkannt, wodurch ein inseriertes Gen in allen *E. coli* Expressionsstämmen transkribiert werden kann. Als Terminatorsequenzen stehen  $t_0$  des Lambda Phagen und T1 aus dem *E. coli* *rrnB* Operon zur Verfügung. Eine synthetische Ribosomenbindestelle RBSII vor der MCS ermöglicht die effiziente Translation der transkribierten mRNA.

#### pQE-70

Der pQE-70 Vektor (QIAGEN) besitzt stromabwärts der multiplen Klonierungsstelle einen (His)<sub>6</sub>-Tag, wodurch das exprimierte Protein diesen C-terminal bei Klonierung über die Restriktionsschnittstellen *SphI* und *BamHI* trägt. Dies wurde zur Reinigung

von Proteinen über Nickel-Chelat-Affinitätschromatografie genutzt, die im tryptophanoperonfreien *E. coli* KK8-Stamm exprimiert wurden. Die Selektion plasmidtragender *E. coli* Zellen erfolgt über eine Ampicillin-Resistenz, die durch Expression des  $\beta$ -Lactamase-Gens (*bla*) ausgeprägt wird.

### 2.2.5 pDMI,1

Der Vektor pDMI,1 (Certa *et al.*, 1986) ist kommerziell als pREP4-Vektor von der Firma QIAGEN erhältlich. Aufgrund seines konstitutiv exprimierten Lac-Repressor-Gens (*lacI*) ist der pDMI,1-Vektor für die Inhibition des Lac-Promotor/Operatorsystems und damit für die unterdrückte Expression eines in den pQE70- (bzw. pDS56/RBS/*SphI*) Vektor klonierten Gens in der gleichen Zelle verantwortlich. Eine gezielte Induktion ist durch Zugabe von 0,5 mM IPTG (Endkonzentration) möglich. Der pDMI,1-Vektor besitzt ein p15-Replikon und das Kanamycin-Resistenzgen (*kan*) als Selektionsmarker.

### 2.2.6 pCFN1

Der Vektor pCFN1 (Maxwell *et al.*, 1999) wurde so konstruiert, dass ein in die Klonierungsstellen *Bgl*II und *Xba*I eingefügtes Gen mit der stromabwärts kodierten Chloramphenicolacetyltransferase fusioniert wird. N-terminal wird das Fusionsprotein mit einem (His)<sub>6</sub>-Tag und einem FLAG-Epitop zum Antikörpernachweis versehen. Zwischen dem Insert und dem *cat*-Gen liegt ein *amber*-Stoppcodon (Abbildung 6). Dadurch ist es möglich, in einem *amber*-Suppressorstamm (z. B. *E. coli* JM101; 2.1) das Fusionsprotein herzustellen, während in einem anderen Stamm die Expression nach dem einklonierten Gen abbricht. Der pCFN1-Vektor enthält einen starken, durch IPTG induzierbaren, Promotor P<sub>trc</sub>, pBR322 und Phagen f1 Replikationsursprünge, ein Ampicillinresistenzgen (*bla*) und ein *lacI*-Gen.

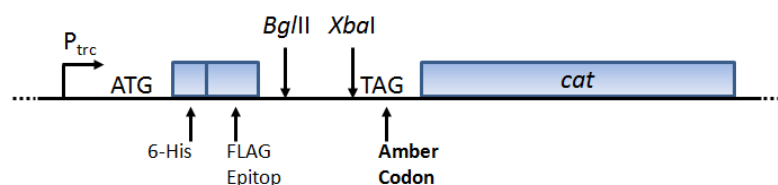


Abbildung 6: Multiple Klonierungsstelle von pCFN1.

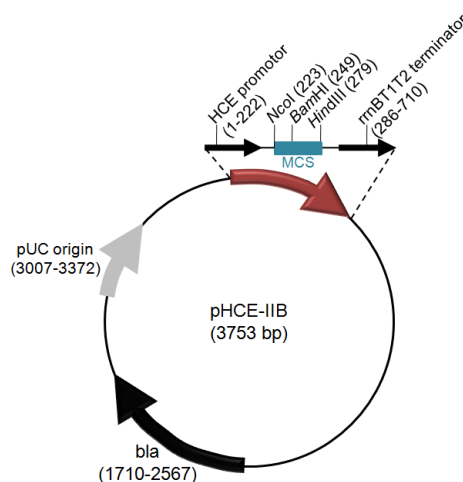
### 2.2.7 pTNA

Der pTNA-Vektor ist eine Variation des pDS56/RBSII-Vektors (Bujard *et al.*, 1987; Stüber *et al.*, 1990). Die T5-Promotor und lac-Operator Sequenzen wurden gegen die (-30)–(-10)-Region des Promotors des Tryptophanase-Operons (p<sub>TNA</sub>) von *E. coli* ausgetauscht, welcher zu einer schwachen konstitutiven Expression führt (Merz *et al.*, 2000). Die Klonierung erfolgt in der Regel über die *SphI*- und *HindIII*-Schnittstellen. Der pTNA-Vektor vermittelt aufgrund der codierten  $\beta$ -Lactamase (*bla*) Ampicillin-Resistenz. Der Vektor wurde von Prof. Charles Yanofsky (Stanford University, USA) zur Verfügung gestellt.

### 2.2.8 pHCE-IIB

Der pHCE-IIB Vektor (Abbildung 7) ist ein Derivat des kommerziellen pUC19-Vektors (FERMENTAS). Der induzierbare lacZ-Promotor wurde durch den stark konstitutiv exprimierenden HCE Promotor des D-AAT Gens aus *Geobacillus toebii* ersetzt (Poo *et al.*, 2002). Dieser ermöglicht im Gegensatz zum pET- oder pQE-System eine Überexpression rekombinanter Proteine ohne Induktion. Die Selektion plasmidtragender *E. coli* Zellen erfolgt über eine Ampicillin-Resistenz, die durch Expression des  $\beta$ -Lactamase-Gens (*bla*) ausgeprägt wird.

Der Vektor wurde freundlicherweise von Dr. Moon Hee Sung (BIOLEADERS CORPORATION, Daejeon, Korea) zur Verfügung gestellt.



**Abbildung 7: pHCE-IIB-Vektor mit MCS und flankierenden Sequenzen.**

Die vollständige MCS setzt sich aus folgenden Restriktionsschnittstellen zusammen: *NcoI* (223), *EcoRI* (228), *SacI* (238), *KpnI* (244), *SmaI* (246), *BamHI* (249), *XbaI* (255), *Sall* (261), *PstI* (271), *SphI* (277), *HindIII* (279)

## 2.2.9 *E. coli*-Hefe-Shuttle-Vektoren

### 2.2.9.1 pGAD424

Der *E. coli*-Hefe-Shuttle-Vektor pGAD424 (6,6 kbp; Bartel *et al.*, 1993) ist ein Beute- (*prey*) Vektor aus dem CLONTECH Matchmaker *yeast-2-hybrid* System. Für Klonierungen in *E. coli* ist eine MCS mit Schnittstellen für verschiedene Restriktionsendonukleasen (*EcoRI*, *SmaI*, *BamHI*, *Sall*, *PstI* & *BglII*), ein ColE1 ori und ein Ampicillinresistenzgen (*bla*) vorhanden. Das *in frame* einklonierte Gen wird in *S. cerevisiae* als Fusionsprotein mit der Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) hergestellt und über das Nukleus-Translokationssignal der Alkohol-Dehydrogenase ( $T_{ADH}$ ) in den Zellkern transportiert. Zur Selektion in *S. cerevisiae* ist ein 2 $\mu$  ori und das Gen für die 3-Isopropylmalat-Dehydrogenase (*leu2*) vorhanden, welches *leu*-defiziente Hefestämme komplementieren kann.

### 2.2.9.2 pAS2-1

Der *E. coli*-Hefe-Shuttle-Vektor pAS2-1 (8,4 kbp; Harper *et al.*, 1993) ist ein Köder- (*bait*) Vektor aus dem CLONTECH Matchmaker *yeast-2-hybrid* System. Für Klonierungen in *E. coli* ist eine MCS mit verschiedenen Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen (*NdeI*, *NcoI*, *SfiI*, *EcoRI*, *XmaI*, *SmaI*, *BamHI*, *Sall* & *PstI*), ein ColE1 ori und ein Ampicillinresistenzgen (*bla*) vorhanden. Das *in frame* einklonierte Gen wird in *S. cerevisiae* als Fusionsprotein mit der Gal4-DNA-Bindedomäne (DBD) hergestellt und über das Nukleus-Translokationssignal der Alkohol-Dehydrogenase ( $T_{ADH}$ ) in den Zellkern transportiert. Zur Selektion in *S. cerevisiae* ist ein 2 $\mu$  ori und das Gen für die Phosphoribosylanthranilat-Isomerase (*trp1*) vorhanden, welches *trp*-defiziente Hefestämme komplementieren kann.

## 2.3 Oligodesoxyribonukleotide

Bei endständigen Amplifikationsprimern sind die genannten Restriktionsschnittstellen unterstrichen. Bei Mutationsprimern sind diejenigen Basen, die von der Originalsequenz abweichen, fett gedruckt. Wurden Primer von Dritten zur Verfügung gestellt, erfolgt die Angabe der Person in Klammern.

### 2.3.1 Vektorspezifische Amplifikations- und Sequenzierungsprimer

#### 5'CyRI

5'-TCA CGA GGC CCT TTC GTC TT -3'

#### 3'CyPstI

5'- TCG CCA AGC TAG CTT GGA TTC T -3'

#### 3'DuetDOWN1

5'- GAT TAT GCG GCC GTG TAC AA -3'

#### 5'DuetUP2

5'- TTG TAC ACG GCC GCA TAA TC -3'

#### 3'GFPdown

5'- GCT TTC CGT ATG TAG CAT CAC CTT -3'

#### 5'malE\_ter\_BamHI

5'- ATC GAG GGA AGG ATT TCA GAA TTC GGA TCC -3'

#### 3'malE-HindIII

5'- GAG GAA AGC TTT CAT GAA ATC CTT CGC TCG AT -3'

#### 5'pAS\_BD (M. Häger)

5'- TCG GAA GAG AGT AGT AA -3'

#### 3'pAS\_BD (M. Häger)

5'- TCG TTT TAA AAC CTA AGA GTC A -3'

#### 5'pCFNup (B. Höcker)

5'- AAC GGT TCT GGC AAA TAT TC -3'

#### 3'pCFNdown (B. Höcker)

5'- TGG TTA TAG GTA CAT TGA G -3'

#### 5'pGAD\_AD (M. Häger)

5'- TAC CAC TAC AAT GGA TG -3'

#### 3'pGAD\_AD (M. Häger)

5'- TTG AAG TGA ACT TGC GGG G -3'

#### 3'pER13a-NotI

5'- AGC AGC GGA GGC AGC GCG GCC GCC -3'

#### 3'pET-BamHI

5'- TTG TCG ACG GAG CTC GAA TTC GGA TCC -3'

#### 5'pET-NdeI

5'- ACT TTA AGA AGG AGA TAT ACA TAT G -3'

#### 5'pET-SphI

5'- ACT TTA AGA AGG AGA TAT AGC ATG C -3'

**5'pET Upstream**

5'- ACG ATG CGT CCG GCG TAG A -3'

**5'pMAL-c2 (*malE*) (T. Seitz)**

5'- GGT CGT CAG ACT GTC GAT GAA GCC -3'

**3'pMAL-c2 (*lacZ*) (T. Seitz)**

5'- GTT TTC CCA GTC ACG AC -3'

**5'pTNA-*SphI***

5'- ATT CAT TAA AGA GGA GAA ATT AAG CAT GC -3'

**3'pTNA-*HindIII***

5'- AGG AGT CCA AGC TCA GCT AAT TAA GCT TT -3'

**5'T7 Promotor**

5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'

**3'T7 Terminator**

5'- GCT AGT TAT TGC TCA GCG G -3'

**2.3.1.1 Sonstige Amplifikationsprimer**

Diese Primer binden im Bereich der angegebenen Aminosäure. Sie dienen vornehmlich dazu, Mutationen im Primerbereich in die wildtypische Sequenz zurück zu mutieren.

**5'*hisA*-D127**

5'- GTG TTC AGT CTG GAC ACT CGA GGT GG -3'

**3'*hisA*-D127**

5'- CCA CCT CGA GTG TCC AGA CTG AAC AC -3'

**5'*hisAF*-crossover**

5'- TCC CTG AGA GAA ATC GAT CAG GCC GT -3'

**3'*hisAF*-crossover**

5'- ACG GCC TGA TCG ATT TCT CTC AGG GA -3'

**5'*hisF*-F138**

5'- GAT GGA GAG TTC ATG GTC TTC ACC TAC TCC GG -3'

**5'*hisF*-Y143**

5'- GAG TTC ATG GTC TTC ACC TAC TCC GGA AAG AAG AAC AC -3'

**3'*hisF*-Y143**

5'- GTG TTC TTC TTT CCG GAG TAG GTG AAG ACC ATG AAC TC -3'

**5'*hisF*-D176**

5'- AGT ATC GAC AGA GAC GGC ACA AAA TCG GG -3'

**3'*hisF*-D176**

5'- CCC GAT TTT GTG CCG TCT CTG TCG ATA CT -3'

**5'*malE*-*SphI***

5'- AGG ACC ATA GAG CAT GCG AAT CGA AGA AGG -3'

### 2.3.2 Amplifikations- und Mutagenisierungsprimer für *hisA*

#### 5' *hisA*-*Bam*HI

5'- ATA GGA TCC CTC GTT GTC CCG GCG ATA GAT -3'

#### 3' *hisA*-*Bam*HI (mit Stoppcodon)

5'- ATA GGA TCC TTA GCG AGC ATA TCT CTT CAT CAC CTC -3'

#### 3' *hisA*-*Bam*HI

5'- ATA GGA TCC GCG AGC ATA TCT CTT CAT CAC CTC -3'

#### 5' *hisA*-*Eco*RI

5'- GAT ATA GAA TTC ATG CTC GTT GTC CCG GCG ATA -3'

#### 5' *hisA*-*Nde*I

5'-AGC CAT ATG CTC GTT GTC CCG GCG ATA GAT CTC TTC AGA GG -3'

#### 5' *hisA*-*Nco*I

5'- ATA CCA TGG TCG TTG TCC CGG CGA TAG ATC T -3'

#### 3' *hisA*-GFP (*Not*I)

5'- TCG AGT GCG GCC GCG TCG AGC ATA TCT -3'

#### 3' *hisA*-*Hind*III/*Eco*RI (entfernt *Eco*RI Restriktionsschnittstelle aus *hisA*)

5'- TGC CAA GCT TTA GCG AGC ATA TCT CTT CAT CAC CTC AAC TGT  
GAG **GAT** TCC -3'

#### 3' *hisA*-*Not*I

5'- ATA GCG GCC GCG GGA GCA TAT CTC TTC ATC AC -3'

#### 5' *hisA*-L2H

5'- AGC CAT ATG **CAC** GTT GTC CCG GCG ATA -3'

#### 5' *hisA*-L2R

5'- AGC CAT ATG **CGC** GTT GTC CCG GCG ATA GAT -3'

#### 5' *hisA*-L2H+V3I

5'-AGC CAT ATG **CAC ATT** GTC CCG GCG ATA -3'

#### 5' *hisA*-L2H+V3I+D8V

5'- AGC CAT ATG **CAC ATT** GTC CCG GCG ATA **GTT** CTC -3'

#### 5' *hisA*-L2H+V3I+D8V+F10Y

5'- AGC CAT ATG **CAC ATT** GTC CCG GCG ATA **GTT** CTC **TAC** AGA  
GGA AAG GT -3'

#### 5' *hisA*-L2H+V3I+F10Y

5'- AGC CAT ATG **CAC ATT** GTC CCG GCG ATA GAT CTC **TAC** AGA GGA  
AAG GT -3'

#### 5' *hisA*-V3I

5'- AGC CAT ATG CTC **ATT** GTC CCG GCG ATA -3'

#### 5' *hisA*-A6E

5'- AGC CAT ATG CTC GTT GTC CCG **GAG** ATA GAT CT -3'

#### 5' *hisA*-A6E+D8V

5'-AGC CAT ATG CTC GTT GTC CCG **GAG** ATA **GTT** CTC TTC AGA GG -3'

#### 5' *hisA*-D8V

5'-AGC CAT ATG CTC GTT GTC CCG GCG ATA **GTT** CTC TTC AGA GG -3'

#### 5' *hisA*-D8N

5'- AGC CAT ATG CTC GTT GTC CCG GCG ATA **AAT** CTC TTC AGA -3'



**5'hisA-T45D+L46E**

5'- ATC GAA GAG GGA TTC **GAC GAG** ATT CAC GTG GTG GAT CT -3'

**3'hisA-T45D+L46E**

5'- AGA TCC ACC ACG TGA ATC **TCG TCG** AAT CCC TCT TCG AT -3'

**5'hisA-L46E**

5'- GGG ATT CAC **AGA GAT** TCA CGT GG -3'

**3'hisAF-L46E**

5'- CCA CGT GAA **TCT CTG** TGA ATC CC -3'

**3'hisA-H75Y**

5'- CCG ATC TGT ATG **TAC** TCG GCA AAT TC -3'

**5'hisA-F111S**

5'- GAA GAT CCT TCT **TCC** CTG AAA TCC CT -3'

**3'hisA-F111S**

5'- AGG GAT TTC AGG **GAA** GAA GGA TCT TC -3'

**3'hisA-F111L**

5'- AGG GAT TTC AGT **AAA** GAA GGA TCT TCC AG -3'

**5'hisA-L150P**

5'- GTT TCT CTT **CCG** AAG AGA CTG AAA GAA TAC GG -3'

**5'hisA-L150S**

5'- GTT TCT CTT **TCG** AAG AGA CTG AAA GAA TAC GG -3'

**5'hisA-D169V**

5'- CAC ACG GAG ATC GAA AAA **GTT** GGC ACT CT -3'

**3'hisA-D169V**

5'- AGA GTG CCA **ACT** TTT TCG ATC TCC GTG TG -3'

**5'hisA-A187D**

5'- ATA GCG ATC GAA **GAT** GAA GTG AAA GTA CTC GC -3'

**2.3.3 Amplifikations- und Mutagenisierungsprimer für hisF****5'hisF-C-NdeI/BamHI**

5'- AGC CAT ATG AGC ATA GGA TCC GGG CAG GCC GTT GTC GTG  
GCG ATA GAT GC -3'

**5'hisF-BamHI**

5'- ATA GGA TCC CTC GCT AAA AGA ATA ATC GCG -3'

**5'hisF-NcoI**

5'- ATA CCA TGG TCG CTA AAA GAA TAA TCG C -3'

**5'hisF-NdeI** (B. Höcker)

5'- AGC CAT ATG CTC GCT AAA AGA ATA ATC GCG -3'

**5'hisF-SphI** (B. Höcker)

5'- AGC TGC ATG CTC GCT AAA AGA ATA ATC GCG -3'

**3'hisF-BamHI** (T. Seitz; 3'hisFC<sub>2</sub>-BamHI/Stopp)

5'- GTG GTG GGA TCC TCA CAA CCC CTC CAG -3'

**3'hisF-EcoRV**

5'- ATA GAT ATC TCA CAA CCC CTC CAG TCT CAC GTT CAC -3'

**3'hisF-GFP (NotI)**

5'- TCG AGT GCG GCC GCC TAA CCC CTC CAG -3'

**3'hisF-HindIII**

5'- CGC AAG CTT TTA CAA CCC CTC CAG TCT CAC -3'

**3'hisF-NotI**

5'- ATA GCG GCC GCC AAC CCC TCC AGT CT -3'

**3'hisF-ssrA** (fügt einen ssrA-Abbautag C-terminal von HisF an)

5'- CGC AAG CTT ACG CCG CCA GCG CAT AGT TTT CAT CGT TCG CCG  
CCA ACC CCT CCA GTC TCA CGT T -3'

**3'hisF\_loop5-NNS**

5'- GAG TTC ATG GTC NNS ACC CAC TCC GGA NNS NNS AAC NNS GGC  
ATA CT -3'

**3'hisF-F23Y**

5'- CCG CTG TCC CTG AGG TTT TCG **TAG** TTC GTT CCC TT -3'

**3'hisF-K37E**

5'- CCA ATT TCG GAA TAG AAC **TCT** CCC AGT TC -3'

**3'hisF-F49S**

5'- GTG ATA TCC AGA **GAA** ACG AGT TCG TCT AT -3'

**3'hisF-D130V**

5'- ACT CTT TTT GCA **ACT** ATC GCC ACG AC -3'

**3'hisF-Y143H**

5'- TCC GGA **GTG** GGT GAA GAC CAT GAA CTC TCC ATC -3'

**3'hisF-Y143H #2**

5'- CCG GAG **TGG** GTG AAG ACC ATG AAC TC -3'

**5'hisF-Y143H+K146E**

5'- TTC ACC **CAC** TCC GGA **GAG** AAG AAC ACG GGC ATA CTT CT -3'

**3'hisF-Y143H+K146E**

5'- AGA AGT ATG CCC GTG TTC TTC **TCT** CCG GAG **TGG** GTG AA -3'

**5'hisF-Y143H+K146E+K147N+T149M**

5'- TTC ACC **CAC** TCC GGA **GAG** AAT AAC **ATG** GGC ATA CTT CT -3'

**3'hisF-Y143H+K146E+K147N+T149M**

5'- AGA AGT ATG CCC **ATG** TTA **TTC** **TCT** CCG GAG **TGG** GTG AA -3'

**5'hisF-Y143H+K146E+T49M**

5'- TTC ACC **CAC** TCC GGA **GAG** AAG AAC **ATG** GGC ATA CTT CT -3'

**3'hisF-Y143H+K146E+T149M**

5'- AGA AGT ATG CCC **ATG** TTC TTC **TCT** CCG GAG **TGG** GTG AA -3'

**5'hisF-Y143H+T149M**

5'- TTC ACC **CAC** TCC GGA AAG AAG AAC **ATG** GGC ATA CTT CT -3'

**3'hisF-Y143H+T149M**

5'- AGA AGT ATG CCC **ATG** TTC TTC TTT CCG GAG **TGG** GTG AA -3'

**5'hisF-T149M**

5'- AAG AAG AAC **ATG** GGC ATA CTT CTG AGA GAC TGG GT -3'

**3'hisF-T149M**

5'- ACC CAG TCT CTC AGA AGT ATG CCC **ATG** TTC TTC TT -3'

**5'hisF-D176V**

5'- AGT ATC GAC AGA **GTC** GGC ACA AAA TCG GGT TAC -3'

**3'hisF-D176V** (A. Lochner)

5'- CCC GAT TTT GTG **CCG ACT** CTG TCG ATA C -3'

**5'hisF-A220K**

5'- GGT GCC GAC **AAG** GCC CTT GCG GCT TCT GTC -3'

**3'hisF-A220K**

5'- GAA GCC GCA AGG GCC **TTG** TCG GCA CCT GCC AG -3'

**5'hisF-A220R**

5'- GGT GCC GAC **CGT** GCC CTT GCG GCT TCT GTC -3'

**3'hisF-A220R**

5'- GAA GCC GCA AGG GCA **CGG** TCG GCA CCT GCC AG -3'

**3'hisF-F229E**

5'- ATA GCG GCC GCC AAC CCC TCC AGT CTC ACG TTC ACT CCG TGT  
TTT TTG AGG TAC TCT TTC AGT TCT CTC ACG TCG ATC TCT CTT **TCG**  
TGA AAG ACA GA -3'

**5'hisF-V234M**

5'- GTC TTT CAC TTC AGA GAG ATC GAC **ATG** AGA GAA CTG -3'

### 2.3.4 Primer zur Herstellung der *E. coli* Deletionsstämme $\Delta hisA$ , $\Delta hisF$ und $\Delta hisA\Delta hisF$

Die Herstellung der Deletionsstämme erfolgte nach dem Protokoll von Datsenko & Wanner (2000).

**5'echisA-SphI**

5'- GGA GAT GGC ATG CTT ATT CCG GCA TTA -3'

**3'echisF-HindIII**

5'- GAC GTT GTT GTA AGC TTA ACA TAT CCT GAT -3'

**5'hisA-pKD3**

5'- GTG AAG GAG GCC ATC GCA TGC TGG CAA AAC GCA TAA GTG TAG  
GCT GGA GCT GCT TC -3'

**3'hisF-pKD3**

5'- ACG AAC GTC GAG ACA TGG GAT TAT GCG TTT TGC CAG CAT ATG  
AAT ATC CTC CTT AG -3'

**5'hisH\_pKD3**

5'- GGT GCT AAG TTG CTG AAA AAC TTC CTG GAG ATG TGA GTG TAG  
GCT GGA GCT GCT TC -3'

**3'hisI\_pKD3**

5'- TTC CCA GTC CAG TTC GCG ACG TTG TTG TTC TGT TAA CAT ATG  
AAT ATC CTC CTT AG -3'

**3'pKD4-k1**

5'- CAG TCA TAG CCG AAT AGC CT -3'

**5'pKD4-k2**

5'- CGG TGC CCT GAA TGA ACT GC -3'

**5'pKD4-kt**

5'- CGG CCA CAG TCG ATG AAT CC -3'

**5'k12 echisH**

5'- ATC GCC CAG TGT AAT TAC GG -3'

**3'k12 echisl**

5'- GGG TTT TGT CTA AGG CTT CC -3'

**2.3.5 Primer zur Herstellung von HisAF-Interaktionsvarianten mit HisH****5'hisA-Ins.[M+L+A]+M1K+L2R**

5'- AGC CAT ATG **CTC GCT AAA AGA** GTT GTC CCG GCG ATA GAT CTC  
TTC AGA-3'

**5'hisA-Ins.[M+L+A]+M1K+L2R+D8V**

5'- AGC CAT ATG **CTC GCT AAA AGA** GTT GTC CCG GCG ATA **GTT** CTC  
TTC AGA GG -3'

**5'hisA-I40S+T45D**

5'- AAA CTC **AGC** GAA GAG GGA TTC **GAC** CTG ATT CAC GTG GTG GAT  
CTC TC -3'

**3'hisA-I40S+T45D**

5'- GAG ATC CAC CAC GTG AAT CAG **GTC** GAA TCC CTC TTC **GCT** GAG  
TTT -3'

**5'hisA-I40S+T45D+L46E**

5'- GTA GAA CTG GTG GAA AAA CTC **AGC** GAA GAG GGA TTC **GAT GAG**  
ATT CAC GT -3'

**3'hisA-I40S+T45D+L46E**

5'- ACG TGA ATC **TCA TCG** AAT CCC TCT TCG **CTG** AGT TTT TCC ACC  
AGT TCT AC -3'

**5'hisA\_S70A+A73I+Ins.[D]+E74I+H75P**

5'- GAG AAA CTC **GCT** GAA TTT **ATC GAT ATA CCA** ATA CAG ATC GGA  
GGC GGG ATC AGA TCG -3'

**3'hisA\_R97D**

5'- TGA GCT CAC GAT CTG TCT **ATC** GTA TCC CAG CTT -3'

## 2.4 Längenstandards

### DNA-Längenstandards

#### **Smart Ladder** (EUROGENTEC)

Polynukleotidgrößen [bp]: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 800, 600, 400, 200

#### **GeneRuler™ 1 kb Plus** (MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot)

Polynukleotidgrößen [bp]: 20000, 10000, 7000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 700, 500, 400, 300, 200, 75

### Proteinlängenstandard

#### **Unstained Protein Molecular Weight Marker** (MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot)

Proteingrößen [kDa]: 116,0 ( $\beta$ -Galaktosidase), 66,2 (Albumin), 45,0 (Ovalbumin), 35,0 (Laktat Dehydrogenase), 25,0 (REase Bsp98I), 18,4 ( $\beta$ -Laktoglobulin), 14,4 (Lysozym)

## 2.5 Enzyme

### **DNA-Polymerasen**

GoTaq DNA-Polymerase	PROMEGA, Mannheim
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt a. M.
Pwo DNA-Polymerase	ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim
<b>Restriktionsendonukleasen</b>	NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt a. M.
<b>T4-DNA-Ligase</b>	MBI FERMENTAS, St.-Leon-Rot
	ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim

## 2.6 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien besaßen den höchstmöglichen Reinheitsgrad und wurden von folgenden Firmen bezogen:

AMERSHAM PHARMACIA Biotech	Freiburg
APPLICHEM GmbH	Darmstadt
BIO101 Inc.	Carlsbad, USA
BIORAD LABORATORIES	München
BIOZYM	Hess. Oldendorf

BODE CHEMIE	Hamburg
BOEHRINGER MANNHEIM	Mannheim
CARL ROTH GMBH & Co. KG	Karlsruhe
DIFCO	Dreieich
FLUKA	Neu-Ulm
GERBU Biotechnik GmbH	Gailberg
GIBCO/BRL	Eggestein
MERCK	Darmstadt
MP BIOCHEMICALS	Illkirch, Frankreich
NATIONAL DIAGNOSTICS	Simerville, NJ, USA
OXOID	Wesel
RIEDEL-DE HAEN	Seelze
ROCHE DIAGNOSTICS	Mannheim
SERVA	Heidelberg
SIGMA-ALDRICH	Deisenhofen
VWR	Leuven, Belgien

## 2.7 Kits

GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	MBI FERMENTAS, St.-Leon-Rot
GeneMorphII <i>Random Mutagenesis</i> Kit	Stratagene, La Jolla, USA
Nucleobond PC100/500 <i>DNA-Extraction</i> Kit	MACHEREY-NAGEL, Düren
Nucleospin Extract II	MACHEREY-NAGEL, Düren
QIAprep spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden

## 2.8 Verbrauchsmaterialien

AlignFlow, Plus flow cytometry alignment beads for 488 nm excitation, 6 µm	INVITROGEN Molecular Probes, Carlsbad, USA
Dialyseschlauch: Visking, Typ 27/32, 14 kDa	ROTH GmbH +Co, Karlsruhe
Einwegspritzen Omnifix® 2 ml, 5 ml und 60 ml	BRAUN Biotech, Melsungen
Elektroporationsküvetten 2 mm	PEQLAB, Erlangen
Faltenfilter	MACHEREY-NAGEL, Düren
Konzentratoren:	
Amicon Ultra 4 bzw. 15 (mwco: 10 kDa) Millipore, Bedford, USA	

Kunststoffküvetten: ½ Mikroküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Kunststoffröhrchen:	
15 ml, 50 ml	SARSTEDT, Nümbrecht
Falcon 15 ml bzw. 50 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Latex-Handschuhe Sempermed	SEMPERIT Technische Produkte GmbH, Wien, Österreich
Membranfilter ME24 Ø47 mm; 0,2 µm	SCHLEICHER&SCHUELL, Dassel
Nitrocellulosefilter (Ø13 mm; Cat#: VSWP01300)	MILLIPORE, Eschborn
NAP5, NAP10 und NAP25 Säulen	GE HEALTHCARE, München
Nitril Untersuchungshandschuhe	VWR, Leuven, Belgien
Parafilm „M“ Laboratory Film	PECHINEY, Plastic Packaging, Menasha, USA
Pasteurpipetten	HIRSCHMANN, Ebermannstadt
PCR-Gefäße 0,2 ml	PEQLAB, Erlangen
Petrischalen 150/25 und 94/16	GREINER bio-one, Nürtingen
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	SARSTEDT, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	ROTH, Karlsruhe
Reaktionsgefäße mit Schraubdeckel 2 ml	SARSTEDT, Nümbrecht
Spritzenfilter Porengröße 0,2 µm	RENNER GmbH, Daunstadt

## 2.9 Geräte

Autoklaven	
München 25	MMM, München
VE-40	SYSTEC GmbH, Wettenberg
Brutschränke	BINDER GmbH, Tuttlingen
Chromatografieanlagen:	
ÄKTA basic better	GE HEALTHCARE, München
ÄKTA purifier 10	GE HEALTHCARE, München
verwendete Säulen:	
Blue Sepharose 6 FF (in XK 26/40)	GE HEALTHCARE, München
HisTrap FF Crude 5 ml	GE HEALTHCARE, München
MonoQ HR 16/10	GE HEALTHCARE, München

MonoQ 5/50 GL	GE HEALTHCARE, München
Superdex 75 HR 10/30	GE HEALTHCARE, München
Cell Densitiy Meter Ultrospec 10	GE HEALTHCARE, München
Circular Dichroismus Spektropolarimeter J-815	Jasco GmbH, Groß-Umstadt
Computer	Dell Optiplex Systems
Elektroporator 2510	EPPENDORF, HAMBURG
<i>Fluorescence-Activated Cell Sorter</i>	DAKO CYTOMATION, Fort Collins, USA
MoFlo Cytometer mit Cyclone Sortier- einheit und Coherent Enterprisell Laser	
Fluoreszenzmikroskop Axio Vision	CARL ZEISS AG, Jena
Fluoreszenz-Spektrometer Cary Eclipse	VARIAN, Darmstadt
Gasbrenner Gasprofi 2SCS	WLD Tec GmbH, Göttingen
Gefrierschrank -80 °C	MDF-U72V, SANYO, Tokyo, Japan
Gefrierschrank -20 °C	LIEBHERR, Nussbaumen
Gefriertrocknungsanlage Lyovac GT2	LEYBOLD-HERAEUS, Hürth
Gelelektrophoresekamern:	
Agarose-Elektorphorese-Apparatur	HOEFER Pharmacia Biotech, USA
SDS-Elektrophoresekammer	
Mighty Small II	HOEFER Pharmacia Biotech, USA
Multi Gel Caster Gelgießstand	GE HEALTHCARE, München
Glaspipetten & Glaswaren	SCHOTT, Mainz
	FISCHER SCIENTIFIC, Schwerte
	NOVOGLAS, Bern, Schweiz
Hamilton Mikroliterspritze, 25 µl	HAMILTON, Banskud, Schweiz
Heizblock-Thermostat HBT-2 131	HLC, Bovenden
Inkubationsschüttler:	
GFL 3033	GFL, Burgwedel
Certomat H	BRAUN Biotech, Melsungen
Certomat BS-1	BRAUN Biotech, Melsungen
Magnetrührer:	
MR0, MR2000	HEIDOLPH, Kehlheim
MR1, MR3001 (beheizbar)	HEIDOLPH, Kehlheim
Microliterpipetten: Research 2, 10, 100, 1000	EPPENDORF, Hamburg
Mikrowelle HMT 842C	BOSCH, Nürnberg
Multi-Doc-It Digital Imaging System	UVP Inc., USA



## Netzgeräte:

Power Supply EPS 301

GE HEALTHCARE, München

Power Pack P25

BIOMETRA, Göttingen

## PCR-Geräte:

Mastercycler personal

EPPENDORF, Hamburg

Mastercycler gradients

EPPENDORF, Hamburg

Peristaltikpumpe Miniplus 2

GILSON Medical Electronics,  
Frankreich

pH-Meter inolab Level1

INOLAB, Weilheim

Pipettus-accu

HIRSCHMANN, Laborgeräte,  
Eberstadt

## Quarzküvetten:

101-QS (Schichtdicke 10 mm)

HELLMA GmbH &amp; Co. KG, Müllheim

105-QS (Schichtdicke 10 mm)

HELLMA GmbH &amp; Co. KG, Müllheim

110- QS (Schichtdicke 1 mm)

HELLMA GmbH &amp; Co. KG, Müllheim

Schütteltisch Rocking Platform

BIOMETRA, Göttingen

Ultraschallgerät Branson Sonifier 250D

HEINEMANN, Schwäbisch Gmünd

UV-Leuchttisch Reprostar

CAMAG Chemie Erzeugnisse, Berlin

UV-Vis Spektralphotometer Cary 100 Bio

VARIAN, Darmstadt

UV-Vis Spektralphotometer V650

JASCO GmbH, Groß-Umstadt

UV-Vis Biophotometer

EPPENDORF, Hamburg

Vakuumpumpe ME 2C

VACUUMBRAND, Wertheim

Vortex Genie 2

SCIENTIFIC IND., Bohemia, USA

## Waagen:

MC1

SARTORIUS, Göttingen

SI-114

DENVER INSTRUMENT, Göttingen

Wasserbad 1003

GFL, Burgwedel

Ultrafree-20 Nanopore-Wasser-Anlage

MILLIPORE, Eschborn

## Zentrifugen:

Centrifuge 5810R

EPPENDORF, Hamburg

Centrifuge 5415D

EPPENDORF, Hamburg

Centrifuge 5415R

EPPENDORF, Hamburg

Sorvall RC 2B, 5C plus

DU PONT Instruments, Bad Homburg

mit SS34- bzw. GS3-Rotoren

## 2.10 Nährmedien für *E. coli*

Zur Sterilisation wurden die Medien 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Bei Selektivmedien wurden die entsprechenden Antibiotika nachträglich, nach Abkühlen der Medien auf ca. 60 °C, in Form von steril filtrierten, 1000-fach konzentrierten Stammlösungen zugegeben.

### Luria-Bertani-(LB)-Medium

0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1,0 % (w/v) NaCl, 1,0 % (w/v) Trypton

### LB-Agar

LB-Medium plus 1,5 % (w/v) Bacto-Agar

### SOB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989)

0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,05 % (w/v) NaCl, 2,0 % (w/v) Trypton

Nach dem Autoklavieren wurden 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 2,5 mM KCl (jeweils steril filtriert) hinzugefügt.

### SOC-Medium

SOB-Medium plus Zugabe von zusätzlich 20 mM Glukose (steril filtriert) nach dem Autoklavieren.

### SOC-Agar

SOC-Medium plus 1,5 % (w/v) Bacto-Agar

Bei den folgenden Medien beträgt das Endvolumen jeweils einen Liter:

### TB-Medium

12 g Trypton, 24 g Hefeextrakt, 4 ml Glycerin (87%)

In insgesamt 900 ml H<sub>2</sub>O lösen, Zugabe von 100 ml sterilem 10× TB-Phosphat (2.12.1) nach dem Autoklavieren.

### M9<sup>-</sup>-Medium

Zu 750 ml sterilem H<sub>2</sub>O wurden zugegeben:

200,0 ml 5× M9 Salze (2.12.1), 2,0 ml MgSO<sub>4</sub> (1 M), 20,0 ml Glucose (20 %), 0,1 ml CaCl<sub>2</sub> (1M)

### M9<sup>-</sup>-Agar

M9<sup>-</sup>-Medium plus 1,5 % (w/v) Bacto-Agar

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz von *E. coli* Deletionsstämmen bei Komplementationstests wurde M9<sup>-</sup>-Agar hergestellt, dem L-Histidin (M9<sup>-</sup><sub>His</sub>) oder L-Tryptophan (M9<sup>-</sup><sub>Trp</sub>) mit einer Endkonzentration von jeweils 20 µg/ml zugefügt wurde.

## 2.11 Nährmedien für *S. cerevisiae*

### YPD-Vollmedium

20 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, mit Wasser auf 950 ml auffüllen, nach dem Autoklavieren 50 ml 40 % steril filtrierte Glukose-Stammlösung zugeben.

### YPDA-Vollmedium

YPD-Vollmedium zuzüglich 30 mg Adenin nach dem Autoklavieren.

### YPD-Agar

YPD-Medium zuzüglich 1,7 % (w/v) Bacto-Agar

### SD (*synthetic dropout*) Minimalmedium

6,7 g YNB (*yeast nitrogen base*, mit Ammoniumsulfat, ohne Aminosäuren, ohne Dextrose), 0,61 g CSM-Ade-His-Leu-Trp (*complete supplement mixture*, enthält alle Nukleotide und Aminosäuren außer Adenin, Histidin, Leucin und Tryptophan), ergibt SD-TLHA-Minimalmedium; bei Bedarf wurden je 20 mg Adenin, Histidin, Leucin und Tryptophan zugegeben (z. B. zur Herstellung von SD-TL), mit Wasser auf 950 ml aufgefüllt und nach dem Autoklavieren 50 ml 40 % steril filtrierte Glukose-Stammlösung zugegeben.

### SD (*synthetic dropout*) Selektivagar

SD-Minimalmedium zuzüglich 1,7 % (w/v) Bacto-Agar

Bei Bedarf wurden je 20 mg Adenin, Histidin, Leucin und Tryptophan zugegeben.

## 2.12 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Puffer steril filtriert und bei Raumtemperatur gelagert. Es wurde MILLIPORE bzw. bidestilliertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) verwendet.

### 2.12.1 Arbeiten mit *E. coli*

#### Antibiotika

Die langfristige Lagerung der gelösten Antibiotika erfolgte nach Sterilfiltrierung bei -20 °C, die kurzfristige Lagerung erfolgte bei 4 °C.

#### Ampicillin-Stammlösung (1000×)

150 mg/ml Ampicillin (Na-Salz) in Wasser gelöst und steril filtriert.

**Chloramphenicol-Stammlösung (1000×)**

30 mg/ml Chloramphenicol in 100 % EtOH gelöst und steril filtriert.

**Kanamycin-Stammlösung (1000×)**

75 mg/ml Kanamycin in Wasser gelöst und steril filtriert.

**Tetrazyklin-Stammlösung (1000×)**

12,5 mg/ml Tetrazyklin in 100 % EtOH gelöst und steril filtriert.

**CaCl<sub>2</sub>**

1 M CaCl<sub>2</sub> in Wasser gelöst, steril filtriert und bei RT gelagert.

**Dulbecco's PBS-Puffer (SIGMA-ALDRICH)****Glucose**

20 % (<sup>w</sup>/<sub>v</sub>) Glucose in Wasser gelöst, steril filtriert und bei RT gelagert.

**Glycerin (87 %)****IPTG-Stammlösung**

0,5 M IPTG in Wasser gelöst, steril filtriert und bei -20 °C gelagert.

**KCl**

1 M KCl in Wasser gelöst, steril filtriert und bei RT gelagert.

**MgCl<sub>2</sub>**

1 M MgCl<sub>2</sub> in Wasser gelöst, steril filtriert und bei RT gelagert.

**MgSO<sub>4</sub>**

1 M MgSO<sub>4</sub> in Wasser gelöst, steril filtriert und bei RT gelagert.

**5× M9<sup>-</sup>-Salze**

64 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 15 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,5 g NaCl, 5,0 g NH<sub>4</sub>Cl, in Wasser gelöst, autoklaviert und bei RT gelagert.

**10× TB-Phosphat**

2,31 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Säure; 0,17 M) und 12,54 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Base; 0,72 M) in 90 ml Wasser gelöst, anschließend auf 100 ml aufgefüllt und autoklaviert.

**TFBI-Puffer**

100 mM KCl, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 30 mM KAc, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % Glycerol

Die Stammlösungen der Einzelkomponenten wurden bei 4 °C gelagert. Der Puffer (100 ml) wurde direkt vor der Verwendung frisch angesetzt.

**TFBII-Puffer**

100 mM Tris/HCl, pH 7,0, 10 mM KCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % Glycerol

Die Stammlösungen der Einzelkomponenten wurden bei 4 °C gelagert. Der Puffer (10 ml) wurde direkt vor der Verwendung frisch angesetzt.

### 2.12.2 Arbeiten mit *S. cerevisiae*

#### LiAc/PEG-Puffer

10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 100 mM LiAc, 40 % PEG, pH 7,5

[8 ml 50 % PEG (in H<sub>2</sub>O gelöst, gegebenenfalls zum Lösen auf 50 °C erwärmen); 1 ml 1 M LiAc (pH 7,5 mit Salzsäure einstellen, autoklavieren); 1 ml 10× TE (100 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 7,5, autoklaviert)]

#### LiAc-Puffer

10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 100 mM LiAc, pH 7,5 [Herstellung: siehe LiAc/PEG-Puffer]

#### TE-Puffer (1×)

10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5, autoklaviert

#### *fish sperm carrier DNA* (10 mg/ml; ROCHE)

Zur Denaturierung 20 min in kochendem Wasser inkubieren und danach sofort auf Eis abkühlen, bei -20 °C lagern, für jede Benutzung erneut denaturieren.

### 2.12.3 Arbeiten mit DNA

#### PCR-dNTP-Lösung (2 mM)

Je 2 mM dNTP (N = A, C, G und T) in Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert.

#### MgCl<sub>2</sub> für epPCR

50 mM MgCl<sub>2</sub> Stammlösung von Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase (NEW ENGLAND BIOLABS) verwendet. Bei -20 °C gelagert.

#### MnCl<sub>2</sub> für epPCR

1 M MnCl<sub>2</sub> in Wasser gelöst, autoklaviert und bei RT gelagert.

### 2.12.4 Agarosegelelektrophorese

#### Agarose (1%)

5 g Agarose wurden in 500 ml 0,5× TBE gelöst, aufgekocht und bei 60 °C gelagert.

#### Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg/ml Ethidiumbromid (EtBr)

#### Sukrose Farbmarker

60 % (<sup>w</sup>/<sub>v</sub>) Sukrose, 0,1 % (<sup>w</sup>/<sub>v</sub>) Bromphenolblau, 0,1 % (<sup>w</sup>/<sub>v</sub>) Xylencyanol FF in 0,5× TBE gelöst

**TBE (5×)**

445 mM Borsäure, 12,5 mM EDTA, 445 mM Tris (resultierender pH-Wert: 8,15)

**2.12.5 Arbeiten mit Proteinen****Aufschlusspuffer für Expressionen im analytischen Maßstab**

100 mM KP, 2 mM EDTA, pH 7,5

**Aufschlusspuffer für Expressionen im präparativen Maßstab**

10 mM oder 50 mM KP, pH 7,5

**Dialyse- und Lagerungspuffer**

5 mM / 10 mM / 50 mM KP pH 7,5

**EDTA-Stammlösung**

250 mM EDTA wurden unter Zugabe von KOH-Plätzchen in 100 ml Wasser gelöst und anschließend mit 1 M KOH der pH-Wert auf 7,5 eingestellt. Lagerung bei RT.

**Harnstoff-Stammlösung für Auffaltungsexperimente**

10 M Urea wurde unter Erhitzen in 50 mM KP (pH 7,5) gelöst. Die exakte Konzentration wurde anschließend refraktometrisch bestimmt (Anhang 7.2).

**Kaliumphosphatpuffer (KP)**

1 M  $K_2HPO_4$  (Base) und 1 M  $KH_2PO_4$  (Säure), durch Mischen wurde der gewünschte pH-Wert eingestellt (i.d.R. pH 7,5).

**HEPES-Puffer für TrpF-Aktivitätsmessungen**

1 M HEPES wurde in 100 ml Wasser eingewogen und der pH-Wert 7,5 durch Titration mit 5 M NaOH eingestellt. Daraus wurde durch Verdünnung eine 50 mM HEPES, pH 7,5 Lösung hergestellt. Beide Lösungen wurden steril filtriert.

**Puffer zur Solubilisierung und Rückfaltung von Proteinen**

1 M, 2 M und 6 M Guanidiniumchlorid in 10 mM KP, pH 7,5

**Puffer für Blue Sepharose 6 FF Affinitätschromatografie**

Laufpuffer: 10 mM KP, pH 7,8, 1 mM DTT

Elutionspuffer: 10 mM KP, pH 7,8, 1 mM DTT, 3,5 M NaCl

**Puffer für Gelfiltration**

50 mM KP, 300 mM KCl, pH 7,5

**Puffer für Ionenaustauschchromatografie**

Laufpuffer: 50 mM KP, pH 7,5

Elutionspuffer: 50 mM KP, pH 7,5, 1,5 M NaCl

**Puffer für Metallchelate-Affinitätschromatografie**

Laufpuffer: 50 mM KP, pH 7,5, 500 mM NaCl, 15 mM Imidazol

Elutionspuffer: 50 mM KP, pH 7,5, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol

Wurden Proteine für Aktivitätsmessungen gereinigt, erfolgte die Reinigung mit 10 mM KP, pH 7,5, anstelle von 50 mM KP, pH 7,5.

**Puffer zur Regenerierung der HisTrap FF Crude Säule**

- 20 mM KP, 500 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH 7,4
- 250 mM NiCl<sub>2</sub>, pH 4,05

**2.12.6 SDS-Polyacrylamidelektrophorese****Ammoniumpersulfat (APS)-Stammlösung (10%)**

10 % (<sup>w</sup>/<sub>v</sub>) APS in Wasser gelöst und steril filtriert. Gelagert wurde die Stammlösung bei -20 °C.

**Coomassie Färbelösung**

0,2 % (<sup>w</sup>/<sub>v</sub>) Coomassie Brilliant Blue G250 und R250, 50 % (<sup>v</sup>/<sub>v</sub>) Ethanol, 10 % (<sup>v</sup>/<sub>v</sub>) Eisessig, filtriert, bei RT lichtgeschützt gelagert

**Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung für den Blot zur N-terminalen Sequenzierung**

45 % (<sup>v</sup>/<sub>v</sub>) Methanol, 9 % (<sup>v</sup>/<sub>v</sub>) Essigsäure, 0,25 % (<sup>w</sup>/<sub>v</sub>) Coomassie Brilliant Blue G250, filtriert, bei RT lichtgeschützt gelagert

**Coomassie Brilliant Blue-Entfärbelösung für das N-terminale Sequenzieren**

50 % Methanol, 40 % Millipore H<sub>2</sub>O, 10 % Essigsäure

**Protogel™**

30 % (<sup>v</sup>/<sub>v</sub>) Acrylamid, 0,8 % (<sup>v</sup>/<sub>v</sub>) Bisacrylamid, bei 4 °C gelagert

**SDS-PAGE Trenngelpuffer**

0,4 % (<sup>w</sup>/<sub>v</sub>) SDS, 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

**SDS-PAGE Sammelgelpuffer**

0,4 % (<sup>w</sup>/<sub>v</sub>) SDS, 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

**SDS-PAGE Laufpuffer (resultierender pH-Wert: 8,5)**

0,1 % (<sup>w</sup>/<sub>v</sub>) SDS, 0,025 M Tris, 0,2 M Glycin

**SDS-PAGE Laufpuffer für N-terminales Sequenzieren**

0,1 % (<sup>w</sup>/<sub>v</sub>) SDS, 0,1 M Tris, 0,1 M Tricin

**SDS-PAGE Probenpuffer (2×):**

2 % (<sup>w</sup>/<sub>v</sub>) SDS, 10 % (<sup>w</sup>/<sub>v</sub>) Glycerin, 5 % (<sup>v</sup>/<sub>v</sub>) β-Mercaptoethanol, 0,01 % (<sup>w</sup>/<sub>v</sub>) Bromphenolblau, 1,25 M Tris/HCl, pH 6,8

**2.13 Software****Lokale Anwendungen**

ÄKTA Unicorn Version 5.01 (318)	© GE HEALTHCARE
Bioedit V.7.0.9	© IBIS BIOSCIENCES, Tom Hall
Cary Eclipse Version 1.1 (175)	© VARIAN Australia Pty. Ltd. 2002
Cary Win UV Version 3.0 (182)	© VARIAN Australia Pty. Ltd. 2002
Corel Draw Version 11/12	© 2003 COREL Corp.
Deep View Swiss PDB Version 3.7	© Guex & Peitsch 1997
Endnote Version 9	© 2000 WINTERTREE Software Inc.
OptiQuant Version 02.50	© Packard Instrument Co.
Pov Ray Version 3.1g	© 1999 POV-Team
PyMOL™ 0.99rc6	© 2006 DELANO SCIENTIFIC LCC.
Seqman™II	© 1989-1999 DNASTAR Inc.
SigmaPlot 8.0/10.0	© 2004/2006 SPSS INC.
Summit Version 3.1	© CYTOMATION Inc., 2001

**Servergestützte Anwendungen**

DaliLite	<a href="http://www.ebi.ac.uk./DaliLite/">http://www.ebi.ac.uk./DaliLite/</a>
ProCheck	<a href="http://www.rcsb.org/">http://www.rcsb.org/</a> (externe Verknüpfung)



## 3 Methoden

---

### 3.1 Vorbereitung von Geräten und Lösungen

Alle hitzestabilen Lösungen und Medien wurden vor Gebrauch 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Glaswaren und hitzestabile Verbrauchsmaterialien, wie z. B. Pipettenspitzen, wurden ebenso autoklaviert und anschließend bei 50 °C im Trockenschrank getrocknet. Hitzelabile Lösungen wurden in Stammlösungen angesetzt und je nach Volumen durch einen Membranfilter der Porengröße 0,2 µm mittels einer Vakuumpumpe oder durch einen Spritzenfilter der Porengröße 0,2 µm filtriert. Lösungen für den Gebrauch an den chromatografischen Anlagen wurden bei Bedarf mindestens 30 min im Exsikkator entgast.

### 3.2 Mikrobiologische Methoden

#### 3.2.1 Anzucht und Lagerung von *E. coli* Stämmen

Alle verwendeten *E. coli* Stämme wurden bei 37 °C unter Schütteln bei 140 rpm (1 Liter Kultur) bzw. 220 rpm (5, 50 und 250 ml Kulturen) angezogen. Die Anzucht erfolgte in der Regel in LB- oder TB-Medium. Bei plasmidtragenden Stämmen wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum (150 µg/ml Ampicillin, 30 µg/ml Chloramphenicol, 75 µg/ml Kanamycin, 12,5 µg/ml Tetrazyklin) aus einer tausendfach konzentrierten, steril filtrierten Stammlösung zugegeben.

Um Einzelkolonien zu erhalten, wurde die Zellsuspension auf Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und üN bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Zur kurzzeitigen Lagerung wurden die Platten oder Suspensionen gut verschlossen und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Zur dauerhaften Lagerung wurden Glycerinkulturen hergestellt, welche bei -80 °C aufbewahrt wurden. Hierzu wurde ein Aliquot einer üN-Kultur im Verhältnis 1:1 in 87 % Glycerin in einem sterilen Schraubdeckelgefäß aufgenommen.

### **3.2.2 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen zur chemischen Transformation (Inoue et al., 1990)**

Zur Präparation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurden 500 ml SOB-Medium mit dem entsprechenden Stamm auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 angezogen. Die Kultur wurde 15 min auf Eis gekühlt, in 50 ml-Röhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation (EPPENDORF Centrifuge 5810R, 4.000 rpm, 10 min, 4 °C) geerntet. Das Zellpellet wurde in 100 ml eiskaltem TFB I-Puffer resuspendiert, erneut unter gleichen Bedingungen abzentrifugiert und das erhaltene Pellet in 10 ml eiskaltem TFB II-Puffer aufgenommen. Sofort nach der Resuspendierung wurden 100 µl Aliquots der Zellsuspension in Eppendorf-Reaktionsgefäße auf Eis überführt und bei -80 °C gelagert.

### **3.2.3 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen**

Zur Transformation chemisch kompetenter Zellen wurde ein Aliquot der Zellen langsam auf Eis aufgetaut und mit etwa 100 ng Plasmid-DNA (maximales Volumen: 20 µl) versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz für 40 bis maximal 45 s einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Danach wurde der Ansatz nochmals für fünf Minuten auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 900 µl LB-Medium folgte eine einstündige Kur bei 37 °C im Schüttler bei 220 rpm, um die Antibiotikaresistenz auszubilden. Bei Transformation eines gereinigten Plasmids wurden 100 µl bzw. geeignete Verdünnungen der Zellsuspension auf Selektivagar ausplattiert. Bei Transformation eines Ligationsansatzes wurde die Zellsuspension für 1 min bei 4000 rpm abzentrifugiert, in 100 µl LB-Medium resuspendiert und anschließend ausplattiert.

### **3.2.4 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen zur Elektrottransformation (Dower et al., 1988)**

Zur Präparation elektrokompenter *E. coli* Zellen wurden 50 oder 200 ml SOB-Medium mit den entsprechenden Zellen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 angezogen. Die Kultur wurde 30 min auf Eis gekühlt, in 50 ml-Röhrchen überführt und die Zellen abzentrifugiert

(EPPENDORF Centrifuge 5810R, 4.000 rpm, 10 min, 4 °C) geerntet. Das Zellpellet wurde in 50 ml eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert und erneut 15 min auf Eis gehalten. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in 20 ml eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert und daraufhin erneut 15 min auf Eis gehalten. Die Zellen wurden nochmals abzentrifugiert und schließlich in 10 ml eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert. Nach einem letzten Inkubations- und Zentrifugationsschritt wurde der Überstand vollständig abgegossen und die Zellen auf Eis gestellt. Das erhaltene Zellpellet wurde in mindestens 1 ml sterilem Wasser aufgenommen und zu je 100 µl Aliquots in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die so erhaltenen elektrisch kompetenten Zellen wurden entweder zur Transformation frisch verwendet oder bei -80 °C in 10 % Glyzerin gelagert.

### **3.2.5 Vorbereitung von DNA für die Elektroporation**

Bei einer Elektroporation muss die verwendete DNA-Lösung eine möglichst geringe Konzentration an Ionen enthalten, da diese beim elektrischen Puls in der Küvette einen Kurzschluss auslösen können. Deshalb muss jede DNA-Lösung, die in einem salzhaltigen Puffer vorliegt (z. B. Ligationsansatz), gegen Wasser dialysiert werden. Hierfür wurden 10–20 µl der DNA-Lösung für mindestens 1 h auf die glänzende Seite eines Nitrocellulosefilters (MILLIPORE) aufgebracht, der in einer kleinen Petrischale auf MILLIPORE-Wasser aufgelegt wurde.

### **3.2.6 Transformation von elektrokompetenten *E. coli* Zellen**

Für die Transformation wurden 100 µl der frischen elektrokompetenten Zellen mit maximal 20 µl salzfreier DNA-Lösung versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Spaltbreite 2 mm) überführt. Nach dem elektrischen Puls (2500 V, 25 µF, 200 Ω) im Elektroporator (bei erfolgreicher Elektroporation lag die Zeitkonstante zwischen 4,0 und 6,0 ms) wurden die Zellen sofort in 1,5 ml SOC-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Danach wurden Aliquots auf Selektivagar ausplattiert und üN bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

### 3.2.7 Bestimmung der Transformationseffizienz

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz ( $T_E$ ) wurde ein Aliquot der kompetenten Zellen wie oben beschrieben (3.2.3 & 3.2.6) mit 100 ng Plasmid-DNA transformiert. Nach dem Kuren wurden je 100  $\mu$ l einer Verdünnungsreihe (unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000 usw.) auf Selektivagar ausplattiert. Die Transformationseffizienz wurde folgendermaßen berechnet:

$$T_E = \frac{n_{\text{Kolonien}} \cdot f}{m_{\text{DNA}}}$$

**Formel 1: Berechnung der Transformationseffizienz.**

$T_E$  Transformationseffizienz (Kolonien pro  $\mu$ g DNA)

$n_{\text{Kolonien}}$  Anzahl der Kolonien

$f$  Verdünnungsfaktor

$m_{\text{DNA}}$  eingesetzte DNA-Menge [ $\mu$ g]

### 3.2.8 *In vivo* Komplementationstest

*In vivo* Komplementationstests wurden in folgenden auxotrophen *E. coli* Stämmen (2.1) durchgeführt:

Histidin-auxotroph:  $\Delta hisA$ ,  $\Delta hisF$  und  $\Delta hisA\Delta hisF$

Tryptophan-auxotroph:  $\Delta trpF$  (Sterner *et al.*, 1995) und  $\Delta trpC$

Die frisch hergestellten, kompetenten Zellen wurden durch Elektroporation (3.2.6) mit pTNA-Konstrukten bzw. pTNA-Genbanken (2.2.7) transformiert und 1 h bei 37 °C in SOC-Medium im Schüttler gekurt. Vor dem Ausplattieren wurden die Zellen durch dreimaliges Zentrifugieren (EPPENDORF Centrifuge 5415D, 1 min, 4000 rpm) und Resuspendieren in 1 ml 1 % (w/v) NaCl gewaschen, um das Vollmedium aus der Kur vollständig zu entfernen. Zum Testen wurden die Zellen anschließend auf M9<sup>-</sup>-Selektionsmedium ausgestrichen. Um die Transformationseffizienz zu bestimmen, wurden die Zellen zusätzlich auf Kontrollplatten mit Histidin bzw. Tryptophan (M9<sup>-</sup><sub>His</sub> bzw. M9<sup>-</sup><sub>Trp</sub>) ausplattiert. Genbanken wurden zusätzlich einem Flüssigtest in selektivem M9<sup>-</sup>-Medium unterzogen. Alle verwendeten Medien enthielten das entsprechende Antibiotikum. Während der Inkubation bei 37 °C erfolgte regelmäßig eine Kontrolle des Zellwachstums.

### 3.2.9 *In vivo* Tests auf Löslichkeit von Proteinen

#### 3.2.9.1 *In vivo* Test auf Löslichkeit eines Proteins mit Hilfe der Chloramphenicolacetyltransferase als Reporter

Zur Abschätzung der Löslichkeit von Proteinen *in vivo* wird bei diesem System die Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) C-terminal an die zu untersuchenden Proteine fusioniert. Zellen, die eine CAT-Fusion mit einem relativ unlöslichen Protein exprimieren, tolerieren geringere Chloramphenicol-Konzentrationen als Zellen, die eine CAT-Fusion mit einem sehr löslichen Protein exprimieren. Der von Maxwell *et al.* (1999) entwickelte CAT-Fusionsvektor pCFN1 (2.2.6) wurde von den Autoren zur Verfügung gestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das System nach Modifizierung des pCFN1-Vektors (4.3.1) als Selektionssystem zur Erhöhung der Löslichkeit von Proteinen in einem gerichteten Evolutionsansatz fungieren. Hierfür wurde ein durch Zufallsmutagenese erzeugtes Genrepertoire im modifizierten pCFN1-Vektor mit dem Gen für die CAT fusioniert und nach Transformation des *E. coli* *amber*-Suppressorstamms JM101 (2.1) bei hohen Chloramphenicol-Konzentrationen auf Varianten mit erhöhter Löslichkeit selektiert.

Nach erfolgreicher Klonierung des fraglichen Gens bzw. eines Genrepertoires in den CAT-Fusionsvektor wurden frisch hergestellte, elektrokompetente Zellen des JM101 *amber*-Suppressorstammes durch Elektroporation (3.2.6) mit den pCFN1-Konstrukten bzw. der pCFN1-Genbank transformiert. Nach sofortiger Zugabe von 200 µg/ml IPTG zur Induktion der Expression des Fusionsproteins wurden die Zellen 2 h bei 37 °C in LB-Medium im Schüttler gekult. Danach wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit IPTG (200 µg/ml) und verschiedenen Chloramphenicol-Konzentrationen (50 bis 500 µg/ml) ausplattiert und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zusätzlich wurden zur Überprüfung der Transformationseffizienz nach dem Kuren verschiedene Verdünnungen ausplattiert. Das Wachstum sichtbarer Kolonien wurde nach 16 h kontrolliert.

### 3.2.9.2 *In vivo* Test auf Löslichkeit eines Proteins mit Hilfe des „Grün Fluoreszierenden Proteins“ als Reporter

Zur Abschätzung der Löslichkeit von Proteinen *in vivo* wird bei diesem System das „Grün Fluoreszierende Protein“ (GFP) C-terminal an die zu untersuchenden Proteine fusioniert. Ist GFP an ein unlösliches, aggregiertes Protein gekoppelt, ist die Bildung des GFP-Chromophors erschwert. Zellen mit einem derartigen Konstrukt fluoreszieren deshalb schwächer als solche, in denen GFP mit einem löslichen Protein fusioniert ist (Waldo *et al.*, 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde eine GFP-Variante (*enhanced* GFP, eGFP) mit erhöhter Fluoreszenzintensität und einem von 396 nm auf 488 nm verschobenen Anregungsmaximum verwendet (Patterson *et al.*, 1997; Tsien, 1998).

Es wurden *E. coli*-Plasmidgenbanken hergestellt, die in pER13a (2.2.2) kloniert an eGFP fusioniert vorlagen. Dabei lag das Fusionskonstrukt durch Zufallsmutagenese randomisiert vor. Für die Untersuchung wurden elektrokompente *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS- (für Sortierungen mit HisAF) bzw. *E. coli* BL21(DE3)-Zellen (für Sortierungen mit HisFA) mit 100 ng Plasmid-DNA transformiert. Als Referenz wurde stets das wildtypische Ausgangskonstrukt mittransformiert. Zur Überprüfung der Transformationseffizienz wurden nach dem Kuren verschiedene Verdünnungen ausplattiert. Mit der restlichen Zellsuspension wurden 50 ml LB<sub>Kan</sub>-Medium inokuliert und üN bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Davon wurden am nächsten Tag jeweils 10 ml LB<sub>Kan</sub>-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und bei Bedarf bei OD<sub>600</sub> = 0,6 die Genexpression durch IPTG induziert. Nach Inkubation für 4 h bei 37 °C und 220 rpm wurde 1 ml der Zellsuspension abgenommen, zentrifugiert (EPPENDORF CENTRIFUGE 5415D, 4000 rpm, RT, 1 min) und das Zellpellet in 1× PBS aufgenommen.

Das *Screening* wurde auf Zellen mit erhöhter Fluoreszenz durchgeführt, um HisAF- oder HisFA-Varianten mit verbesserter Löslichkeit zu isolieren und erfolgte mit Hilfe von Durchflusszytometrie an einem FACS- (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) Gerät.

### 3.2.10 Durchflusszytometrie von *E. coli* Zellen

Bei der Durchflusszytometrie mittels *Fluorescence Activated Cell Sorter* (FACS) können Zellen auf der Basis unterschiedlicher physikalischer und molekularer Eigenschaften analysiert und nach diesen sortiert werden. Durch das verwendete Gerät (Mo Flo Zytometer mit Cyclone-Sortiereinheit, FACS mit Coherent Enterprise II Laser) können drei verschiedene Parameter detektiert werden: das Vorwärtstreulicht (*Forward Scatter*, FSC), das Seitwärtstreulicht (Side Scatter, SSC) und die Fluoreszenzintensität (FL). Der FSC liefert ein Maß für die Größe der analysierten Zellen, die Detektion des SSC erfolgt zur Analyse der Granularität der Zellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich die Fluoreszenz der Zellen nach Anregung bei 488 nm durch einen Argonlaser gemessen.

Die zu vermessenden Zellen wurden in einem 5 ml Probenröhrchen so verdünnt, dass die Anzahl der durch das Gerät analysierten Ereignisse (Zellen) bei 15.000 bis 20.000 pro Sekunde lag. Um einen Überblick über die zu erwartenden Fluoreszenzintensitäten zu erhalten, wurde zunächst jeweils ein analytischer Lauf mit  $3 \cdot 10^6$  Zellen durchgeführt. Bei den anschließenden Sortierungen der Zellen wurden in der ersten Sortierungsrunde meist  $10^8$  Ereignisse analysiert. Die Zellen, deren Fluoreszenzintensität im zuvor definierten *Screening*-Bereich lag, wurden in einem Probenröhrchen gesammelt. Fielen in diesen Bereich mindestens  $10^6$  Zellen, wurden diese ohne erneute Anzucht direkt nochmals sortiert, was die Qualität der Auslese erhöhte. Andernfalls wurden die heraussortierten Zellen in 5 ml LB<sub>Kan</sub>-Medium über Nacht angezogen und am nächsten Tag erneut sortiert. Dieser Zyklus wurde so lange wiederholt, bis eine ausreichende Anreicherung von Zellen im eingestellten *Screening*-Bereich erfolgt war. Diese wurden dann mit Hilfe der Cyclone Sortiereinheit auf LB<sub>Kan</sub>-Agarplatten vereinzelt und angewachsene Kolonien analysiert.

Die Sortierung erfolgt in einem Flüssigkeitsstrahl ( $1 \times$  PBS) mit definiertem Durchmesser (70  $\mu$ m), wobei dieser mit den Zellen den Laserstrahl passiert. Um eine Sortierung von einzelnen Zellen vornehmen zu können, wird der Flüssigkeitsstrahl in einzelne Tropfen unterteilt, wobei jeder Tropfen eine Zelle enthält. Detektoren für das Seitwärts- und Vorwärtstreulicht und die Fluoreszenz nehmen dabei das Signal auf, dass jede einzelne Zelle liefert. Wird dabei eine Zelle mit den zuvor definierten Eigenschaften erkannt, kann diese heraussortiert werden. Dies erfolgt durch ein

elektrisches Feld, in welchem der entsprechende Tropfen eine Ladung erhält und anschließend seitlich in ein Auffanggefäß oder eine LB-Agarplatte abgelenkt wird.

Die Sortierung der Zellen erfolgte mit folgenden Einstellungen am FACS:

Frequenz: 100.000 Hz (für 70 µm Düse)

Amplitude der Düse: 10–15 Volt (legt die Form der Tropfen fest)

Spannung der elektrischen Platten bei Sortierung: 2500 Volt

*Threshold*: Über den *Threshold* wird das Hintergrundrauschen des Geräts eingestellt. Dieser wird so eingestellt, dass ca. 200–300 Ereignisse pro Sekunde gezählt werden, wenn über die Probenaufnahme nur 1× PBS (ohne Zellen) zugeführt wird. Dadurch wird das Hintergrundrauschen beschränkt, gleichzeitig ist die benötigte Empfindlichkeit des Geräts für die Sortierung von *E. coli* Zellen gegeben.

Photomultiplier-Spannung:

FSC (*Forward Scatter*): 400 Volt

SSC (*Side Scatter*): 750 Volt

FL1 (Fluoreszenz): 600 Volt

Probendruck: 57–59 psi

Die Photomultiplier-Spannung des Fluoreszenzdetektors wurde gegebenenfalls den aktuellen Einstellungen des FACS-Geräts angepasst.

Die Kalibrierung des Geräts mit Hilfe von 6 µm *Beads* erfolgte bei einer Photomultiplier-Spannung von 400 Volt für alle drei Detektoren. Der Strahlengang und der Tropfenabrisspunkt des FACS wurden vor jedem Lauf justiert und fokussiert.

Die Datenverwaltung erfolgte durch das Softwarepaket SUMMIT™ 3.1.

Zur Reinigung nach jedem Lauf wurde das System 30 min mit 1× PBS und anschließend 30 min mit 70 % Ethanol über die Probenaufnahme gespült. Wurde auf LB-Platten sortiert, dann geschah dies mit einer Rate von 300 Ereignissen pro Sekunde. Platten mit vereinzelt Kolonien wurden üN bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C für weitere Analysen gelagert.

### 3.2.11 Herstellung kompetenter *S. cerevisiae* Zellen

Zur Herstellung kompetenter *S. cerevisiae* Hefezellen wurden 5 ml YPD Medium mit einer frisch gewachsenen Einzelkolonie angeimpft, diese durch kräftiges Vortexen im Medium resuspendiert und unter Schütteln mit 220 rpm bei 30 °C üN inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurde eine 50 ml YPD-Kultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 angeimpft und



etwa 5 h bei 30 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1 inkubiert. Zur Zellernte wurde die Suspension abzentrifugiert (EPPENDORF 5810R, 4.000 rpm, 5 min, RT). Nach einem Waschschrift mit 25 ml H<sub>2</sub>O und erneut zentrifugieren (EPPENDORF 5810R, 4.000 rpm, 5 min, RT), wurde das Zellpellet in 800 µl LiAc-Puffer resuspendiert und bei 4 °C zur Verwendung innerhalb von einer Woche gelagert.

### **3.2.12 Li-Ac-Transfektion von *S. cerevisiae* Zellen und Überprüfung mittels Auxotrophie-Marker**

Die Transfektion des auxotrophen Hefestammes AH109 erfolgte nach der Li-Ac-Methode (Ito *et al.*, 1983; Abelson *et al.*, 2003). Dazu wurde ein 20 µl Aliquot der kompetenten Zellen auf Eis mit einem Gemisch aus 1 µg Plasmid-DNA und 60 µg denaturierter *fish sperm carrier* DNA versetzt und gründlich gevortext. Bei Kotransfektion mit zwei Plasmiden wurden jeweils 0,5 µg DNA eingesetzt. Danach wurden 80 µl LiAc/PEG-Puffer zugegeben, erneut kräftig gevortext, gefolgt von einer Schüttelinkubation der Zellen für 1 h bei 30 °C und 220 rpm. Nach Zugabe von 15 µl DMSO wurde der Transformationsansatz für 15 min einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt, für 2 min auf Eis inkubiert und für 10 s bei 13200 rpm (EPPENDORF 5415D) pelletiert, in 30 µl YPDA resuspendiert und 1 h mit 220 rpm bei 30 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit H<sub>2</sub>O wurden die Zellen in einem Volumen von 15 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und Aliquots auf SD-Selektivagar ausplattiert, bei 30 °C inkubiert und mehrfach täglich auf Zellwachstum kontrolliert. Gewöhnlich waren nach 3–5 Tagen deutlich sichtbare Kolonien herangewachsen.

Eine erfolgreiche Transfektion mit den verwendeten Plasmiden pGAD424 und pAS2-1, die *leu2* (3-Isopropylmalat-Dehydrogenase) bzw. *trp1* (Phosphoribosylantranilat-Isomerase) kodieren, ermöglicht den Zellen Wachstum auf Platten ohne die Auxotrophie-Marker Leucin (L) und Tryptophan (T). Die Transformationseffizienzen erreichten bis zu 10<sup>5</sup> pro µg eingesetzter DNA.

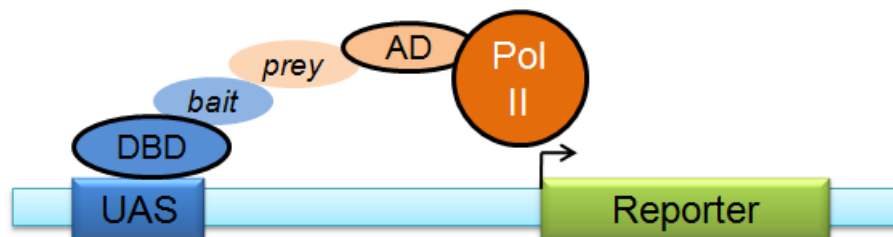
### **3.2.13 Qualitativer Interaktions-Assay mittels Interaktions-Marker (*yeast-2-hybrid*)**

Das *yeast-2-hybrid* System ist ein *in vivo* Assay zur qualitativen Analyse von Protein-Protein-Interaktionen und wurde erstmals von Fields & Song (1989) beschrieben.

Basierend auf dem ursprünglichen System sind zahlreiche Variationen entwickelt worden.

Das Prinzip des *yeast-2-hybrid* Systems beruht auf der Beobachtung, dass der eukaryotische Transkriptionsfaktor GAL4 aus zwei funktionell unabhängigen Domänen, der DNA-bindenden Domäne (DBD) und der Aktivierungsdomäne (AD) besteht, und die räumliche Nähe der AD zum Transkriptionsstart eines Gens ausreicht, um dessen Transkription durch die RNA-Polymerase zu initialisieren (Brent & Ptashne, 1985; Hope & Struhl, 1986). Zum Test auf Interaktion werden die beiden zu analysierenden Proteine als Fusionsproteine mit der DBD bzw. der AD kloniert. Dabei wird das mit der DBD fusionierte Protein als Köder (*bait*) bezeichnet und das an AD fusionierte Protein als Beute (*prey*; Abbildung 8).

Findet keine Interaktion zwischen Köder und Beute statt, bindet das Fusionsprotein DBS-Köder zwar an die UAS (*upstream activation sequence / upstream activation site of transcription*), ohne jedoch das Fusionsprotein AD-Beute rekrutieren zu können. Bei Interaktion von Köder und Beute kommt die AD in räumliche Nähe der an die UAS bindenden DBD und kann somit die RNA-Polymerase II aktivieren, was zur Transkription der Reportergene führt.



**Abbildung 8: Das yeast-2-hybrid System detektiert Komplexbildung zwischen zwei Proteinen *in vivo*.**

Der Köder (*bait*) bildet ein Fusionsprotein mit der DNA-bindenden Domäne (DBD) von GAL4, die an die Transkriptionsaktivierungsdomäne bindet (UAS, *upstream activation sequence*). Die Beute (*prey*) liegt als Fusionsprotein mit der Aktivierungsdomäne (AD) von GAL4 vor, welche die RNA-Polymerase II (Pol II) bindet. Durch Komplexbildung von Köder und Beute wird die RNA-Polymerase II in räumliche Nähe der UAS gebracht, was zur Expression der Reportergene führt.

Die Reportergene, auch Interaktionsmarker genannt, kodieren meist für Enzyme aus Aminosäurestoffwechselwegen, die es den Zellen ermöglicht, auf entsprechenden Minimalmedien zu wachsen oder Enzyme, die bei Zugabe entsprechender Substrate ins Medium eine Farbreaktion katalysieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Interaktionsmarker *his3* (Imidazolglycerolphosphat-Dehydratase, ermöglicht Wachstum auf Medium ohne Histidin) und *ade2* (Phosphoribosylaminoimidazol-Carboxylase, vermittelt Wachstum auf Medium ohne Adenin) verwendet.

Nach frischer Kotransfektion (3.2.12) mit den Plasmiden pGAD424 und pAS2-1 wurden die Zellen auf SD-Selektivagar (SD-TLHA) und zum Nachweis der erfolgreichen Transfektion auf SD-TL Agar ausplattiert, bei 30 °C inkubiert und mehrfach täglich auf Koloniebildung kontrolliert. Gewöhnlich waren nach 3–5 Tagen deutlich sichtbare Kolonien herangewachsen.

### **3.3 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.3.1 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Zellen erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Le Gouill *et al.*, 1994). Durch Zugabe von SDS und Natriumhydroxid werden die Zellen zunächst aufgeschlossen. Anschließend werden die Proteine und die genomische DNA durch Neutralisation der Suspension unter Zugabe von Ammoniumacetat gefällt, während die zirkuläre Plasmid-DNA in Lösung bleibt.

##### **3.3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA in analytischen Mengen (Mini-Präparation)**

Die analytische Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte entweder mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen oder mit Hilfe des GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit der Firma Fermentas. Dazu wurden aus einer frischen üN Kultur 5 ml Zellsuspension abzentrifugiert (EPPENDORF 5415D 13200 rpm, 1 min, RT). Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte anschließend nach den Angaben des Herstellers. Zur Elution wurden stets 50 µl steriles Wasser verwendet. Die gewonnene DNA wurde bei -20 °C gelagert.

##### **3.3.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA in präparativen Mengen (Midi/Maxi-Präparation)**

Die Isolierung von Plasmid-DNA zu präparativen Zwecken erfolgte durch das NucleoBond® PC 100 (Midi-Präparationen) oder NucleoBond® PC 500 Kit (Maxi-Präparationen) von Macherey-Nagel.

Für Midi-Präparationen wurden 50 ml einer *E. coli* üN-Kultur abzentrifugiert (EPPENDORF 5810R, 4.000 rpm, 10 min, 4 °C). Die anschließende Isolierung der

Plasmid-DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers unter Verwendung der AX100 Säulen. Der Elutionsschritt wurde mit 50 µl sterilem Wasser durchgeführt. Die Plasmidpräparation wurde bei -20 °C gelagert.

Maxi-Präparationen wurden zur Gewinnung von Plasmid-Genbanken durchgeführt. Dazu wurden die auf großen Platten (Ø 14,5 cm) gewachsenen Zellen mit Hilfe von flüssigem LB-Medium und einem sterilen Spatel abgeschabt. Die so gewonnene Zellmasse wurde abzentrifugiert (EPPENDORF 5810R 4000 rpm, 10 min, 4 °C) und das Plasmidgemisch im präparativen Maßstab nach Angaben des Herstellers isoliert. Pro Maxi-Präparation wurden maximal 5 g Zellmasse verwendet.

### 3.3.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde fotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz entspricht eine OD<sub>260</sub> von 1 (mit  $^{0,1\%}A_{260} = 20 \text{ cm}^2\text{mg}^{-1}$  und einer Küvetten-Schichtdicke von 1 cm) einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml dsDNA (bzw. 35 µg/ml RNA oder 33 µg/ml ssDNA).

Dadurch kann die DNA-Konzentration wie folgt berechnet werden:

$$c_{dsDNA} = \frac{A_{260} \cdot 50 \cdot f}{1000}$$

**Formel 2: Bestimmung der DNA-Konzentration.**

$c_{dsDNA}$	Konzentration an doppelsträngiger DNA [µg/µl]
$A_{260}$	Absorption bei 260 nm
$f$	Verdünnungsfaktor

Eine saubere DNA-Lösung sollte oberhalb von 300 nm keine messbare Absorption zeigen und einen OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> Quotienten von mindestens 1,8 aufweisen.

### 3.3.3 Agarosegelelektrophorese

Im Agarosegel werden DNA-Fragmente ihrer Länge entsprechend aufgetrennt. Durch Zugabe des DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid werden die Banden im Gel unter UV-Licht sichtbar (Sharp *et al.*, 1973). Zur Herstellung eines Agarosegels wurde 1 % (w/v) Agarose in 0,5 % TBE-Puffer durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen auf 50–60 °C wurden 0,2 µl der Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml) pro ml Agarose hinzugegeben, die Lösung in eine Gelkammer gegossen und ein Taschenkamm eingesetzt. Nach dem Erkalten wurde

das fertige Gel mit 0,5 % TBE-Puffer überschichtet und der Taschenkamm wieder entfernt. Die DNA-Proben wurden bei Bedarf mit 10× DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 190 V für etwa 20 min durchgeführt. Die negativ geladene DNA wandert durch die angelegte Spannung zur Anode, wobei unterschiedlich lange DNA-Fragmente durch das Agarosenetz unterschiedlich stark gebremst werden.

Mit UV-Licht der Wellenlänge 302 nm wurden die DNA-Fragmente detektiert und mit Hilfe des Imager Multi-Doc-It Digital Imaging System die Gele dokumentiert. Als Größenstandard wurden 5 µl des GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder von Fermentas verwendet.

### **3.3.3.1 Isolierung von DNA-Fragmenten**

Unter UV-Licht der Wellenlänge 302 nm wurden gewünschte Fragmentbanden mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion der DNA erfolgte mit Hilfe des Nucleospin® II-Kits von Macherey-Nagel laut Anleitung des Herstellers. Nach einer PCR wurde die isolierte DNA in 40 µl, nach einem präparativen Verdau in 30 µl Wasser aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

### **3.3.4 Enzymatische Manipulation von dsDNA**

#### **3.3.4.1 Spaltung von dsDNA mit Restriktionsendonukleasen**

Für die spezifische Spaltung von dsDNA wurden Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet (Sambrook *et al.*, 1989, Wilson & Murray, 1991), die eine palindromische Erkennungssequenz besitzen. Diese erzeugen einzelsträngige Überhänge, sogenannte *sticky-ends* mit 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden. Für analytische Spaltungen wurde maximal etwa 1 µg DNA mit 20 U von jedem Restriktionsenzym für 2 bis 3 h in einem Volumen von ca. 50 µl in entsprechendem Puffer bei 37 °C inkubiert. Für präparative Spaltungen zur späteren Ligation von Fragmenten wurde die gesamte Menge an erhaltenem PCR-Produkt und 2 µg Vektor-DNA mit 10 bis 30 U von jedem Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von je 50 µl verdaut. Die Inkubation erfolgte in Abhängigkeit des Restriktionsenzyms bei 37 °C für 2 h bzw. üN. Die Reaktionen wurden in dem jeweils vom Hersteller

empfohlenen Puffer durchgeführt. Der Anteil der Restriktionsenzyme im Reaktionsansatz sollte nicht mehr als 10 % des Volumens betragen, da die glycerinhaltige Lösung, in der die Enzyme gelagert werden, deren Aktivität beeinflussen kann. Die Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (3.3.3) und für die Ligation aus dem Gel aufgereinigt (3.3.3.1).

#### **3.3.4.2 Ligation von DNA-Fragmenten**

Zur Ligation wurden geschnittener Vektor und Fragment in einem abgeschätzten molaren Verhältnis von 1 zu 4 gemischt. Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 1 U T4-DNA-Ligase (Fermentas) im entsprechenden Puffer üN bei 16 °C im Thermocycler oder 1 h bei RT. Danach wurden kompetente *E. coli* Zellen mit dem Ansatz chemisch (3.2.3) transformiert.

Zur Ligation von Genbanken wurde geschnittener Vektor (pTNA, pER13a oder pCFN1) und randomisiertes Fragment ebenfalls in einem abgeschätzten molaren Verhältnis von 1 zu 4 gemischt. Die Reaktion erfolgte stets in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 1 U T4-DNA-Ligase (Roche) im entsprechenden Puffer üN bei 16 °C im Thermocycler. Danach wurden kompetente *E. coli* Zellen mit dem Ansatz elektrisch (3.2.5 und 3.2.6) transformiert.

#### **3.3.5 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Standard- und *touchdown*-PCR**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR; Mullis & Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988) ermöglicht die Vervielfältigung definierter DNA-Fragmente *in vitro*. Dies geschieht über zyklisches Wiederholen von Denaturierung der doppelsträngigen DNA, gefolgt von Anlagerung (*Annealing*) zweier Primer (synthetische Oligonukleotide, die das zu amplifizierende DNA-Fragment flankieren) und enzymatischer DNA-Synthese (*Extension*). Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgt exponentiell. Die Reaktion wurde immer in einem Volumen von 50 µl in einem Thermocycler (Deckeltemperatur 110 °C) durchgeführt. Die Reaktionen erfolgten mit je 5–100 ng zu amplifizierender DNA-Matrize, 2,5 U GoTaq® DNA-Polymerase, 5× Green GoTaq® Reaktionspuffer (enthält 7,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Endkonzentration: 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) und

Auftragspuffer), je 0,2 mM dNTPs und jeweils 1 µM der beiden Primer. Ein Standard PCR-Programm setzte sich wie folgt zusammen:

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer
1. Denaturierung	95	3 min
2. Denaturierung	95	45 s
3. Primer-Anlagerung	$T_A$	45 s
4. Extension	72	1 min/kb
5. Finale Extension	72	5 min
7. Lagerung	8	∞

Die Schritte 2 bis 4 wurden 30-mal wiederholt.

Die optimale Anlagerungstemperatur  $T_A$  der Primer wurde nach folgenden Gleichungen (Chester & Marshak, 1993) ermittelt, wobei der GC-Gehalt und die Länge der Primer berücksichtigt werden:

$$T_M = 69,3 + 0,41 \cdot (\%GC) - \frac{650}{n}$$

**Formel 3: Berechnung der Schmelztemperatur eines Oligonukleotids.**

$T_M$  Schmelztemperatur des Primers [°C]  
 $\%GC$  GC-Gehalt des Primers [%]  
 $n$  Anzahl der Nukleotide des Primers

$$T_A = \left( \frac{T_{M1} + T_{M2}}{2} \right) - 3^\circ C$$

**Formel 4: Berechnung der optimalen Anlagerungstemperatur der Primer in einer PCR-Reaktion.**

$T_A$  Annealing-Temperatur [°C]  
 $T_{M1}$  &  $T_{M2}$  Schmelzpunkte der eingesetzten Primer

Führte eine PCR mit der berechneten Anlagerungstemperatur nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen, wurde eine *touchdown*-PCR durchgeführt. Hierbei wurde die  $T_A$  während der PCR schrittweise von 60 °C auf 45 °C erniedrigt:

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]
1. Denaturierung	95	5
2. Denaturierung	95	1
3. Primer-Anlagerung	$T_A$	1
4. Extension	72	1
5. Finale Extension	72	10
7. Lagerung	8	∞

Die Schritte 2 bis 4 wurden jeweils siebenmal mit  $T_A = 60, 55, 50, 47$  und  $45\text{ °C}$  wiederholt.

Dieses Vorgehen kann hilfreich sein, wenn die beiden verwendeten Primer sehr unterschiedliche  $T_M$ -Werte besitzen. Darüber hinaus wird durch die anfängliche hohe Anlagerungstemperatur die Spezifität der PCR-Amplifikation erhöht und dadurch weniger Nebenprodukte gebildet.

Die optimale *Annealing*-Temperatur wurde zum Teil auch experimentell bestimmt. Hierfür wurden mehrere PCR-Ansätze parallel angesetzt. Im Gradienten-Cycler (EPPENDORF Mastercycler ep) konnte ermittelt werden, welche die höchste Ausbeute an spezifischem Amplifikationsprodukt lieferte. Die Spanne des Gradienten lag zumeist im Bereich einer Anlagerungstemperatur zwischen  $50$  bis  $70\text{ °C}$ .

Zur fehlerfreien Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen wurde die Phusion™ *High-Fidelity* DNA-Polymerase verwendet, da diese im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase eine  $3' \rightarrow 5'$ -*Proofreading*-Aktivität besitzt. Die Reaktionen erfolgten in einem Gesamtvolumen von  $50\text{ }\mu\text{l}$  mit je  $1\text{--}50\text{ ng}$  zu amplifizierender DNA-Matrize,  $1\text{ U}$  Phusion™ DNA-Polymerase,  $5\times$  Phusion™ HF-Reaktionspuffer (enthält  $7,5\text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ; Endkonzentration:  $1,5\text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ), je  $0,2\text{ mM}$  dNTPs und jeweils  $1\text{ }\mu\text{M}$  der beiden Primer. Ein Standard-PCR Programm für die Phusion™ DNA-Polymerase setzte sich folgendermaßen zusammen:

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer
1. Denaturierung	98	30 s
2. Denaturierung	98	10 s
3. Primer-Anlagerung	$T_A$ (Formel 4)	20 s
4. Extension	72	30 s ( $15\text{--}30\text{ s/kb}$ )
5. Finale Extension	72	4 min
7. Lagerung	8	$\infty$

Die Schritte 2 bis 4 wurden 35-mal wiederholt. Standardmäßig wurde eine Anlagerungstemperatur von  $65\text{ °C}$  gewählt, die in der Regel zu einer erfolgreichen Amplifikation des gewünschten Fragments führte.

### 3.3.6 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung des Erfolgs einer Klonierung wurde ein Insert-Screening mittels Kolonie-PCR durchgeführt. Dazu wurden auf Selektivplatten gewachsene



Einzelkolonien dem PCR-Ansatz hinzugefügt und bei dem Denaturierungsschritt von 95 °C aufgeschlossen. Hierzu wurden die Zellen mit einer Pipettenspitze von der Platte gepickt und kurz auf dem Boden des PCR-Gefäßes verstrichen. Die freigesetzte DNA diente in den folgenden Amplifikationsrunden als Matrize. Als Primer wurden in der Regel genflankierende Plasmidprimer eingesetzt. Das Volumen des Ansatzes betrug jeweils 20 µl. Im Ansatz waren je 1 U GoTaq® DNA-Polymerase, 5× Green GoTaq® Reaktionspuffer, 0,1 mM dNTPs und 0,5 µM der Primer enthalten. Die Amplifikation erfolgte mittels Standard-Protokoll wie in 3.3.5 beschrieben.

### **3.3.7 PCR-Methoden zur gerichteten und zufälligen Mutagenese**

#### **3.3.7.1 Megaprimer-PCR (Sarkar & Sommer, 1990)**

Die Megaprimer-PCR ist eine Form der DNA-Manipulation, mit der gerichtet Punktmutationen eingeführt werden. In einer ersten PCR wird der Megaprimer hergestellt, indem mit Hilfe eines genflankierenden Primers und eines Primers, der die Mutation enthält, ein Fragment (der Megaprimer) amplifiziert wird. Dieser Megaprimer wird mittels präparativer Gelelektrophorese (3.3.3.1) gereinigt und dient zusammen mit dem das Gen auf der gegenüberliegenden Seite flankierenden Primer zur Amplifizierung des gesamten Gens in einer zweiten PCR. Die erste und zweite PCR wurden nach beschriebener Methode (3.3.5) durchgeführt. Die optimale Anlagerungs-temperatur des Megaprimers wurde wenn nötig experimentell ermittelt. In der Regel wurde diese Methode gewählt, wenn die zu mutagenisierende Position innerhalb der ersten oder der letzten 100 Basen eines Gens lag.

#### **3.3.7.2 *Overlap Extension*-PCR (Ho et al., 1989)**

Bei der *Overlap Extension* (SOE) -PCR zur gerichteten Mutagenese werden zwei zueinander komplementäre Mutationsprimer von 25 bis 35 bp Länge definiert, die im zentralen Bereich den gewünschten Nukleotidaustausch tragen. Im ersten Schritt werden in getrennten PCR-Ansätzen mit diesen Primern in Kombination mit je einem genflankierenden Primer von der gleichen Matrize zwei überlappende Genfragmente amplifiziert und mittels präparativer Gelelektrophorese (3.3.3.1) gereinigt. Diese Fragmente überlappen im Bereich der ausgetauschten Nukleotide und dienen in

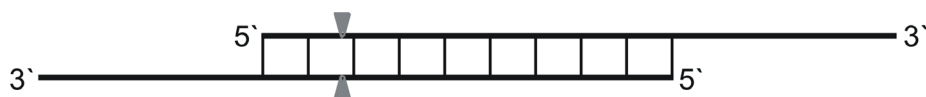
einer zweiten PCR als Matrize, um in Kombination mit genflankierenden Primern das vollständige Gen mit den ausgetauschten Nukleotiden zu amplifizieren.

Diese Mutagenisierungsmethode wurde gewählt, wenn die zu mutagenisierende Position relativ mittig im Gen lag, so dass die beiden überlappenden Fragmente eine vergleichbare Länge aufwiesen. Die Amplifikation erfolgte mittels Standard-Protokoll wie in 3.3.5 beschrieben.

### 3.3.7.3 QuickChange-PCR

Diese Methode erlaubt die positionsspezifische Mutagenese einzelner Nukleotide eines Gens oder einer Vektorposition in einem doppelsträngigen Vektor. Die von Stratagene (La Jolla, CA) entwickelte Mutagenisierungsmethode wurde nach einem veränderten Protokoll durchgeführt (Zheng *et al.*, 2004).

Soll eine Position eines Gens mutagenisiert werden, muss dieses bereits im Vektor kloniert vorliegen. Wird eine Position in einem Vektor mutagenisiert, wird dieser als Matrize verwendet. Nach dem von Zheng *et al.* (2004) entwickelten Protokoll werden zwei Primer mit komplementären 5'-Enden und freien 3'-Enden verwendet. Die zu mutagenisierende Position liegt im komplementären Bereich des Primerpaars (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Schematische Darstellung der partiell komplementären Primer für eine QuickChange-PCR.**

Die grauen Dreiecke symbolisieren die zu mutagenisierende Position (modifiziert nach Zheng *et al.*, 2004).

Für die QuickChange-PCR wurde die Phusion™ *High-Fidelity* DNA-Polymerase verwendet, da diese eine 3' → 5'-*Proofreading*-Aktivität besitzt. Die Reaktionen erfolgten in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit je 1 ng der als Ganzes zu amplifizierende DNA-Matrize, 1 U Phusion™ DNA-Polymerase, 5× Phusion™ HF-Reaktionspuffer (enthält 7,5 mM MgCl<sub>2</sub>; Endkonzentration: 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), je 0,2 mM dNTPs und jeweils 1 µM der beiden Primer. Ein QuickChange-PCR Programm für die Phusion™ DNA-Polymerase setzte sich folgendermaßen zusammen:

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer
1. Denaturierung	98	3 min
2. Denaturierung	98	10 s
3. Primer-Anlagerung	T <sub>A</sub> (Formel 4)	30 s
4. Extension	72	80 s
5. Finale Extension	72	10 min
7. Lagerung	8	∞

Die Schritte 2 bis 4 wurden 25mal wiederholt. Standardmäßig wurde eine Anlagerungstemperatur von 70 °C gewählt, die in der Regel zu einer erfolgreichen Amplifikation des gewünschten Fragments führte.

Anschließend wurde durch ein analytisches Agarosegel der Erfolg der QuickChange-PCR überprüft. War amplifizierter Vektor erkennbar, wurde der PCR-Ansatz über präparative Gelelektrophorese gereinigt (3.3.3.1) und anschließend das Ursprungsplasmid durch Zugabe von 20 U *DpnI* (spaltet nur methylierte DNA) im empfohlenen Reaktionspuffer für 1 h bei 37 °C verdaut. War kein amplifizierter Vektor erkennbar, erfolgte der Restriktionsverdau mit *DpnI* direkt im PCR-Ansatz. Von dem neu amplifizierten Vektor wurde 1 µl zur Transformation chemisch-kompetenter *E. coli* XL1 Blue MRF' Zellen eingesetzt.

Wenn eine Position in einem Gen, welches in einem Vektor kloniert vorliegt, mittels QuickChange-PCR ausgetauscht werden sollte und die Amplifikation des Vektors mit der Phusion™ *High-Fidelity* DNA-Polymerase fehlschlug, konnte auf die GoTaq® DNA-Polymerase zurückgegriffen werden. Aufgrund der fehlenden 3' → 5'-*Proofreading*-Aktivität wurde in diesem Fall das mutierte Gen aus dem amplifizierten Vektor über einen Restriktionsverdau herausgeschnitten und in einen entsprechend verdauten Vektor ligiert. Dies erfolgte, um Artefakte, die durch nicht gewünschte Mutationen im amplifizierten Vektor entstehen, zu vermeiden.

War die QuickChange-PCR nach dem beschriebenen Protokoll nicht erfolgreich, wurde das Protokoll nach Wang & Malcolm (1999) modifiziert. Nach diesem Protokoll werden zwei separate PCRs mit je 50 µl angesetzt. Dabei enthält der erste Ansatz nur den 5'-Primer, der zweite Ansatz enthält nur den 3'-Primer. Nach zehn Zyklen wurden je 25 µl aus jedem Ansatz entnommen, vereint und für weitere 30 Zyklen amplifiziert. Das weitere Vorgehen entsprach der oben beschriebenen Methode.

### 3.3.7.4 Zufallsmutagenese durch *error-prone* PCR

Zur Einführung zufälliger Punktmutationen in ein Gen wurde die Methode der *error-prone* PCR (epPCR) benutzt (Leung *et al.*, 1989). Hierbei wurde die GoTaq<sup>®</sup> DNA-Polymerase verwendet. Diese besitzt keine 3' → 5'-*Proofreading*-Aktivität, wodurch es im Schnitt zu  $8 \cdot 10^{-6}$  bis  $2 \cdot 10^{-4}$  Fehlern pro Nukleotid kommt (Eckert & Kunkel, 1990; Cline *et al.*, 1996). Die Fehlerrate kann durch Verwendung ungleicher Konzentrationen der verschiedenen Desoxynukleotide (Fromant *et al.*, 1995; Vanhercke *et al.*, 2005) sowie durch den Zusatz von MnCl<sub>2</sub> weiter gesteigert werden (Beckmann *et al.*, 1985; Leung *et al.*, 1989). In der vorliegenden Arbeit wurde die Fehlerrate durch eine Kombination von ungleichen Desoxynukleotid-Konzentrationen und den Zusatz von MnCl<sub>2</sub> eingestellt. Die optimale Anlagerungstemperatur der verwendeten Primer wurde experimentell ermittelt und lag i. d. R. bei 53,4 °C. Ein Standardansatz für eine epPCR ist im folgenden Schema dargestellt:

Komponente	Volumen [µl]	Konzentration bzw. Menge im epPCR-Ansatz
DNA Matrize (25 ng/µl)	1	25 ng
5'-Primer (50 µM)	1	1 µM
3'-Primer (50 µM)	1	1 µM
dATP (10 mM)	1,75	0,35 mM
dCTP (10 mM)	2	0,4 mM
dGTP (10 mM)	1	0,2 mM
dTTP (50 mM)	1,35	1,35 mM
MnCl <sub>2</sub> (5 mM)	7,5	0,75 mM
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1	1 mM
5× Green GoTaq <sup>®</sup> Puffer	10	enthält 1,5 mM MgCl <sub>2</sub>
GoTaq <sup>®</sup> DNA-Polymerase (5U/µl)	1	5 U
H <sub>2</sub> O	ad 50	-

Die angegebenen Mengen der dNTPs wurden in Fromant *et al.* (1995) beschrieben und bereits erfolgreich zur Erstellung von Genbanken verwendet (Drummond *et al.*, 2005).

Um die Effizienz der epPCR zu überprüfen, wurden von jeder Genbank zehn Klone vollständig sequenziert und hinsichtlich der Zahl der Mutationen und des Verhältnisses von Transitionen zu Transversionen (Ts/Tv) analysiert. Durch die Wahl dieses epPCR-Ansatzes sollte das Verhältnis von Ts/TV deutlich ausgeglichener sein

als bei einer *ep*PCR, in der nur  $\text{MnCl}_2$  zur Mutagenese zugesetzt wird (Fromant *et al.*, 1995).

Die Anzahl der Basenaustausche pro Gen wurde wie folgt berechnet:

$$A_{Basen} = \frac{\sum a_{Basen}}{n_{Seq}}$$

**Formel 5: Berechnung der durchschnittlichen Basenaustausche pro Gen durch *ep*PCR.**

$A_{Basen}$  durchschnittliche Anzahl der Basenaustausche pro Gen  
 $a_{Basen}$  Anzahl der Basenaustausche pro analysiertem Gen  
 $n_{Seq}$  Anzahl der sequenzierten Gene

### 3.3.8 Herstellung von Genbanken

Zunächst wurde das Gen, von dem eine Bank angelegt werden sollte, mit Hilfe der *ep*PCR (3.3.7.4) randomisiert und das Reaktionsprodukt sowie der Zielvektor, mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die Ligation (3.3.4.2) erfolgte in mehreren Ansätzen (i. d. R. 6–9 Ansätze à 20 µl) bei 16 °C üN. Elektrokompente Zellen (3.2.4) wurden mit jeweils 6 µl Ligationsansatz transformiert (3.2.6), d. h., pro Genbank wurden 20–30 Transformationen durchgeführt. Die Zellen von jeweils zehn Transformationssansätzen wurden vor der Inkubation bei 37 °C in 50 ml Falcons vereinigt und anschließend für 1 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Nach der Kur wurden die Zellen abzentrifugiert (EPPENDORF Centrifuge 5810R, 4000 rpm, 10 min, 25 °C) und danach in 8 ml SOC-Medium resuspendiert. Daraufhin wurde die Zellsuspension in Aliquots à 200 µl auf großen SOC-Selektivagarplatten (Ø 14,5 cm, 40 Stück) ausgestrichen. Zur Bestimmung der Größe der Genbank (3.3.8.1) wurden zusätzlich jeweils 100 µl verschiedener Verdünnungen auf selektivem SOC-Agar (Ø 8,5 cm) ausplattiert.

Für das Erstellen von Genbanken wurden *E. coli* XL1 Blue MRF' bzw. der  $\Delta hisA$ - $\Delta hisF$  Stamm verwendet. Letzterer hat sich als vorteilhaft erwiesen, um bei Selektion auf HisA- oder HisF-Aktivität falschpositive Klone durch *E. coli* eigene Enzyme zu vermeiden. Nach dem Anwachsen der Zellen wurden die SOC-Platten mit einem sterilen Spatel und LB-Medium abgeschabt und die dabei entstehende Bakteriensuspension vereinigt und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde gewogen und die Plasmidgenbank über Maxi-Präparationen (3.3.1.2) isoliert.

### 3.3.8.1 Bestimmung der Größe einer Genbank

Zur Bestimmung der Größe einer Genbank wurden 100 µl der transformierten Zellen  $10^{-1}$  bis  $10^{-8}$ -fach verdünnt und auf kleinen SOC-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Nach Inkubation bei 37 °C üN wurden die Kolonien ausgezählt und die Anzahl der transformierten Zellen nach Formel 6 bestimmt.

$$n_T = n_K \cdot f \cdot V_s$$

**Formel 6: Bestimmung der Anzahl der transformierten Zellen.**

$n_T$	Anzahl der transformierten Zellen
$n_K$	Anzahl der Kolonien auf der Agarplatte
$f$	Verdünnungsfaktor
$V_s$	Volumenfaktor (Volumen der nach der Transformation insgesamt ausplattierten Zellsuspension, geteilt durch 100 µl)

Anschließend wurden 20 Einzelkolonien zufällig ausgewählt und über eine Kolonie-PCR (3.3.6) die Ligationseffizienz ( $L$ ) nach Formel 7 bestimmt.

$$L = \frac{n_V}{n_G} \cdot 100$$

**Formel 7: Bestimmung der Ligationseffizienz in Prozent.**

$n_V$	Anzahl der Kolonien mit Vollängenkonstrukt
$n_G$	Anzahl der analysierten Kolonien

Die Größe der Genbank ( $G$ ) berechnet sich dann nach Formel 8 aus dem Produkt der Anzahl an transformierten Zellen ( $n_T$ ) und der Ligationseffizienz ( $L$ ):

$$G = n_T \cdot \frac{L}{100}$$

**Formel 8: Bestimmung der Größe einer Genbank aus Formel 6 und Formel 7.**

### 3.3.9 DNA-Sequenzierung

Die Bestimmung der Nukleotidsequenzen von mutagenisierten und klonierten Genen erfolgte durch die Firma Geneart (Regensburg, [www.geneart.com](http://www.geneart.com)). Es wurde das Kettenabbruchverfahren von Sanger (Sanger *et al.*, 1977) auf einem ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer von Applied Biosystems verwendet. Bei diesem Verfahren werden verschiedene fluoreszenzmarkierte 2',3'-Didesoxynukleotide zusätzlich zu den 2'-Desoxynukleotiden in der *Thermal Cycle Sequencing* Reaktion (Sears *et al.*, 1992; Slatko, 1994) eingesetzt. Dadurch entstehen 3'-terminal fluoreszenzmarkierte

Einzelstrang-Abbruchfragmente, die gelelektrophoretisch aufgetrennt werden können. Die Nukleotidsequenz kann anschließend abgelesen werden. Die abgegebenen Proben mit einem Gesamtvolumen von 8 µl enthielten zwischen 100 und 300 ng DNA und jeweils 10 pmol eines Sequenzierungsprimers, wodurch die DNA linear amplifiziert wurde. Die im ABI-Format erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm SeqMan analysiert.

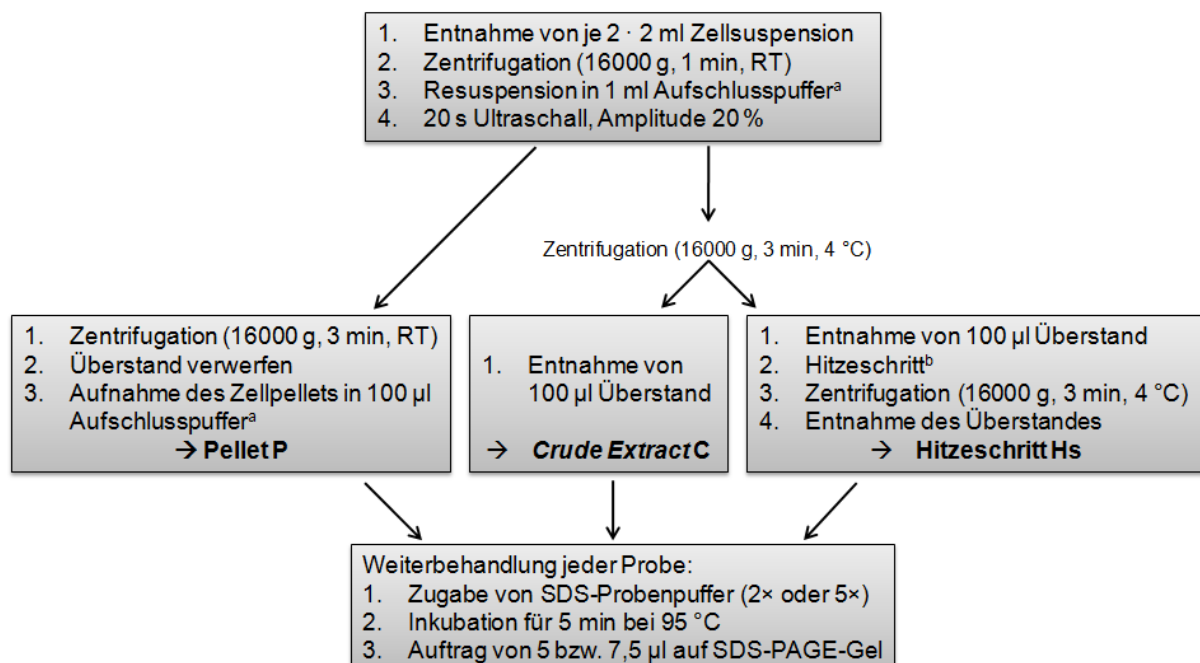
### 3.4 Proteinchemische Methoden

#### 3.4.1 Genexpression und Proteinanreicherung

##### 3.4.1.1 Expression und Anreicherung von Proteinen im analytischen Maßstab

Um zu überprüfen, ob sich die klonierten Gene überexprimieren lassen und in welcher Fraktion des Zellextraktes sich das Protein befindet, wurde eine Expression im analytischen Maßstab („Probeexpression“) durchgeführt.

Hierbei wurden zweimal 5 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika versetzt, aus einer frischen üN-Kultur einer Einzelkolonie auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und bei 37 °C mit 220 rpm geschüttelt. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,4–0,6 wurde jeweils eine Kultur mit 0,5 mM IPTG induziert, während die andere uninduziert blieb. Nach Inkubation für 4 h bzw. üN wurden jeweils 4 ml Aliquots der Zellen abgenommen und die löslichen (= *Crude extract C*) bzw. unlöslichen (= Pellet P) Proteinfractionen nach folgendem Schema (Abbildung 10) aufgetrennt und analysiert.



**Abbildung 10: Schematische Darstellung des Vorgehens einer Probeexpression.**<sup>a</sup>: 100 mM KP, pH 7,5, 2 mM EDTA<sup>b</sup>: HisAF-D8V+Y140H+F226E: 60 °C, 15 min; HisA-Varianten: 75 °C, 15 min; HisF-Varianten: 75 °C, 20 min**3.4.1.2 Expression und Anreicherung von Proteinen im präparativen Maßstab**

Zur Aufreinigung der Proteine wurde 1 l LB oder TB-Medium (HisAF-Varianten in der Regel aus mindestens 2 l Kulturmedium) mit den entsprechenden Antibiotika in einem 3 l Glaskolben mit einer frischen Vorkultur einer Einzelkolonie auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und bei 37 °C und 120 rpm im Schüttler inkubiert. Falls die Probeexpression (3.4.1) ergab, dass eine IPTG-Induktion notwendig war, wurde bei einer OD<sub>600</sub> von 0,4–0,6 mit 0,5 mM IPTG induziert.

Zur präparativen Expression von HisAF-Varianten wurde die Kultur 30 min vor Induktion auf 20 °C abgekühlt und bei dieser Temperatur gehalten. Die Expression aller Varianten erfolgte üN. Danach wurden die Zellen geerntet (Sorvall RC5B plus, GS3 Rotor, 4000 rpm, 10 min, 4 °C) und das Zellpellet mit 35 ml 10 mM KP, pH 7,5 pro 1 l Kultur resuspendiert. Zum Zellaufschluss wurden die Zellen auf Eis sonifiziert (Amplitude 40 %; 2 min mit 20 s Ultraschall, 20 s Pause). Die Lösung wurde dann zentrifugiert (Sorvall RC5B plus, SS34 Rotor, 13000 rpm, 30 min, 4 °C) und, je nach Löslichkeit des rekombinanten Proteins, das Pellet (P) oder der *Crude extract* (C) weiterverarbeitet.

**3.4.1.3 Proteinpräparation aus der unlöslichen Zellfraktion**

Befand sich das hergestellte Protein in der unlöslichen Fraktion (Pellet P) des Zellextraktes (*inclusion bodies*), so wurde es durch Solubilisierung in chaotropher Lösung und anschließende Rückfaltung schrittweise in eine lösliche Form überführt (Kleemann, 1995). Dazu wurde das Pellet nach zweimaligem Waschen mit 10 mM KP, pH 7,5 in 20 ml 6 M Guanidiniumchlorid (GdmCl), 10 mM KP, pH 7,5 aufgenommen und 30 min bei RT unter ständigem Rühren inkubiert. Anschließend wurden 20 ml 1 M GdmCl, 10 mM KP, pH 7,5 zugegeben und die Lösung weitere 30 min bei RT unter ständigem Rühren inkubiert. Nach Abzentrifugation (Sorvall RC5B plus, SS34 Rotor, 13000 rpm, 15 min, 4 °C) ungelöster Bestandteile wurde der nun gelöste Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 70 ml 2 M GdmCl, 10 mM KP, pH 7,5 gemischt. Daraufhin wurde die Lösung dreimal gegen 5 l 50 mM KP, pH 7,5 dialysiert, wodurch das GdmCl praktisch vollständig entfernt und



damit die Rückfaltung des Proteins induziert wurde. Zur Abtrennung von erneut ausgefallenem Protein wurde nach der Dialyse der Inhalt des Dialyseschlauches abzentrifugiert (Sorvall RC5B plus, SS34 Rotor, 19000 rpm, 30 min, 4 °C).

Das rückgefaltete Protein im Überstand war zumeist sehr sauber und musste nur in Ausnahmefällen einer weiteren Reinigung unterzogen werden.

### **3.4.2 Proteinreinigung aus der löslichen Zellfraktion**

#### **3.4.2.1 Hitzeschritt**

Für folgende Proteine wurde in 10 mM KP, pH 7,5 ein Hitzeschritt wie angegeben durchgeführt:

- HisA und HisA-Varianten: 15 min bei 75 °C
- HisF und HisF-Varianten: 20 min bei 75 °C
- HisAF-D8V+Y140H+F226E: 15 min bei 60 °C

Durch die anschließende Zentrifugation (Sorvall RC5B plus, SS34 Rotor, 13000 rpm, 30 min, 4 °C) wurden die ausgefallenen Wirtsproteine abgetrennt und das rekombinante Protein aus dem Überstand mittels Nickel-Chelat-Affinitätschromatografie weiter angereichert.

#### **3.4.2.2 Metallchelate-Affinitätschromatografie**

Die Metallchelate-Affinitätschromatografie wurde mit der Säule HisTrap™ FF crude (GE HEALTHCARE; CV: 5 ml; max. Druck: 0,3 MPa) durchgeführt. Diese Säule besteht aus Sepharose 6 (FastFlow) Medium und dem daran gebundenem Chelator Iminodiacetische Säure (IDA). IDA besitzt sechs Koordinationsstellen, wobei an drei Koordinationsstellen Metallionen ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  oder  $\text{Fe}^{3+}$ ) immobilisiert werden können, während die anderen drei zur Komplexierung von Stickstoff- und Schwefelatomen von Histidinen, Tryptophanen oder Cysteinen zur Verfügung stehen. Proteine, die gentechnisch mit einem N- oder C-terminalem  $(\text{His})_6\text{-Tag}$  fusioniert wurden, binden nach Beladung der Säule mit Metallionen (in dieser Arbeit wurde stets  $\text{Ni}^{2+}$  verwendet) sehr spezifisch an die Säule, da die Metallionen zusätzliche Koordinationsstellen für die Histidine bereitstellen. Die Elution von gebundenem Protein erfolgt durch Anlegung eines Imidazolgradienten, wobei die Imidazolmoleküle mit den chemisch äquivalenten Histidinseitenketten des Proteins

um die Bindestellen an der Säule konkurrieren. In den Auftragspuffern darf sich weder EDTA noch DTT befinden. EDTA würde die gebundenen Nickelionen komplexieren und damit von der Säule entfernen, während DTT die Ionen zu elementarem Nickel reduzieren würde.

Die Beladung der Säule mit Nickelionen erfolgte nach Angaben des Herstellers und wurde bei Bedarf durchgeführt.

Die Reinigung wurde an der Chromatografie-Anlage ÄKTA™ Purifier 10 (GE HEALTHCARE) nach folgender Methode durchgeführt:

<b>Flussrate:</b>	4 ml/min
<b>Equilibrierung:</b>	2 CV Laufpuffer <sup>a</sup>
<b>Beladen:</b>	30–60 ml Proteinlösung in 10 mM KP, pH 7,5
<b>Waschen:</b>	5 CV Laufpuffer <sup>a</sup>
<b>Eluieren:</b>	15 CV Gradient von 15–500 mM Imidazol mit Elutionspuffer <sup>b</sup> ; es wurden Fraktionen à 2 ml gesammelt.
<b>Reinigung der Säule:</b>	5 CV Elutionspuffer <sup>b</sup>
<b>Equilibrierung:</b>	5 CV Laufpuffer <sup>a</sup>
<b>Spülen und Lagerung der Säule:</b>	5 CV H <sub>2</sub> O; 3 CV 20 % Ethanol

<sup>a</sup>: Wurden Proteine gereinigt, die für enzymkinetische Messungen verwendet werden sollten, wurde folgender Laufpuffer verwendet: 10 mM KP, pH 7,5, 500 mM NaCl, 15 mM Imidazol; ansonsten wurde der entsprechende Puffer mit 50 mM KP, pH 7,5 verwendet.

<sup>b</sup>: Wurden Proteine gereinigt, die für enzymkinetische Messungen verwendet werden sollten, wurde folgender Elutionspuffer verwendet: 10 mM KP, pH 7,5, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol; ansonsten wurde der entsprechende Puffer mit 50 mM KP, pH 7,5 verwendet.

Die Elution der Proteine wurde über die Messung der Absorption bei 260 und 280 nm verfolgt. Die weitere Analyse der Elutionsfraktionen erfolgte über SDS-PAGE (3.5.2). Saubere Fraktionen wurden vereinigt und in der Regel gegen 5 l 5 mM KP, pH 7,5 dialysiert, wenn das Protein für enzymkinetische Messungen verwendet werden sollte. Ansonsten erfolgte die Dialyse gegen 50 mM KP, pH 7,5 (3.4.2.5).

Lag das rekombinant hergestellte Protein zu diesem Zeitpunkt noch nicht in genügender Reinheit vor, dann kamen weitere chromatografische Verfahren zum Einsatz.

### 3.4.2.3 Affinitätschromatografie mittels Blue Sepharose

Als Matrix wurde Blue Sepharose 6 FF (GE HEALTHCARE) verwendet, welches mit dem immobilisierten Liganden Cibacron Blue F3G-A eine breite Palette von NADP<sup>+</sup>- und NAD<sup>+</sup>-bindenden Proteinen bindet. HisA, HisA-Varianten und HisAF-Varianten binden vermutlich aufgrund struktureller Ähnlichkeit ihrer Substrate mit Nukleotiden an die Matrix (Schwander, 1997). Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei selbst gepackte Säulen eingesetzt. Anfangs wurde eine Blue Sepharose 6 FF Säule mit einem Säulenvolumen von 40 ml benutzt und später eine Säule mit 18,5 ml CV (max. Druck: 0,5 MPa).

Die Reinigung wurde an der Chromatografie-Anlage ÄKTA™ Purifier 10 (GE HEALTHCARE) Anlage nach folgender Methode durchgeführt:

<b>Flussrate:</b>	4 ml/min
<b>Equilibrierung:</b>	2 CV Laufpuffer <sup>a</sup>
<b>Beladen:</b>	ca. 25 ml Proteinlösung in 10 mM KP, pH 7,5
<b>Waschen:</b>	1,5 CV Laufpuffer <sup>a</sup>
<b>Eluieren:</b>	3 CV Gradient von 0–3,5 M NaCl mit Elutionspuffer <sup>b</sup> ; es wurden Fraktionen à 3 ml gesammelt.
<b>Reinigung der Säule:</b>	2 CV Elutionspuffer <sup>b</sup>
<b>Equilibrierung:</b>	2 CV Laufpuffer <sup>a</sup>
<b>Spülen und Lagerung der Säule:</b>	5 CV H <sub>2</sub> O; 3 CV 20 % Ethanol

<sup>a</sup>: 10 mM KP, pH 7,8, 1 mM DTT

<sup>b</sup>: 10 mM KP, pH 7,8, 1 mM DTT, 3,5 M NaCl

Die Elution der Proteine wurde über die Messung der Absorption bei 260 und 280 nm verfolgt. Die weitere Analyse der Elutionsfraktionen erfolgte über SDS-PAGE (3.5.2). Saubere Fraktionen wurden vereinigt und gegen 5 l 5 mM KP pH 7,5 dialysiert (3.4.2.5). Meist wurde diese Säule zur weiteren Reinigung von HisAF-Varianten, die enzymkinetisch vermessen werden sollten, im Anschluss an die Nickel-Chelat-Affinitätschromatografie (3.4.2.2) verwendet.

### 3.4.2.4 Ionenaustauschchromatografie

Die Ionenaustauschchromatografie beruht auf der kompetitiven Wechselwirkung von geladenen Molekülen, wobei Proteine mit Salzionen um die geladenen Positionen

auf einer Ionenaustauschermatrix konkurrieren. Zuerst bindet das geladene Molekül an die fixierten Ladungen des Trägermaterials. Im Anschluss daran erfolgt die Verdrängung und Elution des Proteins entweder durch eine steigende Salzkonzentration oder durch die Änderung des pH-Werts. Die Ladung eines Proteins wird hauptsächlich von den Aminosäuren mit geladenen Seitenketten bestimmt. So sind im sauren und neutralen pH-Bereich die Aminogruppen, überwiegend von Lys, Arg und His, protoniert und das Protein zeigt ein kationisches Verhalten, während im neutralen und basischen Bereich die Carboxygruppen der Seitenketten von Asp und Glu negative Ladungen tragen und somit das Protein als Anion vorliegt. Die Gesamtladung eines Proteins ist deswegen von der Aminosäurezusammensetzung und vom pH-Wert der umgebenden Lösung abhängig. Bei Trägermaterialien, die selbst positive Ladungen aufweisen und Anionen zu binden vermögen, spricht man von Anionenaustauschern, während man bei negativ geladenen Trägermaterialien, welche Kationen binden können, von Kationenaustauschern spricht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit der Anionenaustauschersäule MonoQ 16/10 (GE HEALTHCARE; CV: 20 ml) gearbeitet.

Die Reinigung wurde an der Chromatografie-Anlage ÄKTA™ Purifier 10 (GE HEALTHCARE) nach folgender Methode durchgeführt:

<b>Flussrate:</b>	4 ml/min
<b>Equilibrierung:</b>	2 CV Laufpuffer <sup>a</sup>
<b>Beladen:</b>	ca. 35 ml Proteinlösung in 50 mM KP, pH 7,5
<b>Waschen:</b>	10 CV Laufpuffer <sup>a</sup>
<b>Eluieren:</b>	15 CV Gradient von 0–1,5 M NaCl mit Elutionspuffer <sup>b</sup> ; es wurden Fraktionen à 4 ml gesammelt.
<b>Reinigung der Säule:</b>	3 CV Elutionspuffer <sup>b</sup>
<b>Equilibrierung:</b>	3 CV Laufpuffer <sup>a</sup>
<b>Spülen und Lagerung der Säule:</b>	5 CV H <sub>2</sub> O; 3 CV 20 % Ethanol

<sup>a</sup>: 50 mM KP, pH 7,5

<sup>b</sup>: 50 mM KP, pH 7,5, 1,5 M NaCl

Die Elution der Proteine wurde über die Messung der Absorption bei 260 und 280 nm verfolgt. Die weitere Analyse der Elutionsfraktionen erfolgte über SDS-PAGE (3.5.2).

Saubere Fraktionen wurden vereinigt und gegen 5 l 50 mM KP pH 7,5 dialysiert (3.4.2.5). Meist wurde diese Säule zur Reinigung von HisFwt verwendet.

#### **3.4.2.5 Dialyse von Proteinlösungen**

Falls bei einer Proteinlösung der Puffer gewechselt oder Salze entfernt werden mussten, wurde gegen einen mindestens 100-fachen Volumenüberschuss des Puffers bei 4 °C im Kühlraum dialysiert. Hierzu wurde ein Dialyseschlauch (Visking) mit einer molekularen Ausschlussgrenze von 14 kDa verwendet, welcher das Protein zurückhält, während niedermolekulare Substanzen die Membran passieren können. HisA- und HisAF-Varianten, die enzymkinetisch charakterisiert werden sollten, wurden stets zweimal gegen 5 l 5 mM KP, pH 7,5 dialysiert. Wurden diese HisAF-Varianten über zwei Säulen (3.4.2.2 & 3.4.2.3) gereinigt, erfolgte die Dialyse zwischen den beiden Reinigungen gegen 10 mM KP, pH 7,5. Wurde das Protein für andere Charakterisierungen gereinigt, erfolgte die Dialyse gegen 5 l 50 mM KP, pH 7,5.

#### **3.4.2.6 Einkonzentrieren von Proteinlösungen**

Die Proteinlösungen wurden mit Hilfe der Amicon<sup>®</sup> Zentrifugenröhrchen (Amicon Ultra 4 bzw. 15; molekulare Ausschlussgrenze: je 10 kDa) über eine semipermeable Membran nach Herstellerangaben (Eppendorf Centrifuge 5810R, 4000 rpm, 4 °C) einkonzentriert. Die Dauer der Zentrifugation richtete sich nach dem Volumen des einzukonzentrierenden Proteins.

#### **3.4.2.7 Lagerung von gereinigtem Protein**

Die gereinigten und konzentrierten Proteine wurden in flüssigen Stickstoff getropft und bei -80 °C gelagert.

### 3.5 Analytische Methoden

#### 3.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration durch Absorptionsspektroskopie

Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin sowie Disulfidbrücken (Cystine) absorbieren UV-Licht in einem Wellenlängenbereich von 250 bis 300 nm. Aus der Aminosäuresequenz kann nach Pace *et al.* (1995) der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{280}$  (Formel 9) und daraus, unter Einbeziehung des Molekulargewichtes, der spezifische Extinktionskoeffizient ( $^{0,1\%}A_{280}$ ) errechnet werden (Formel 10).

$$\epsilon_{280} = \sum Trp \cdot 5500 + \sum Tyr \cdot 1490 + \sum Cystine \cdot 125$$

**Formel 9: Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{280}$ .**  
 $\epsilon_{280}$  molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm [ $M^{-1}cm^{-1}$ ]

$$^{0,1\%}A_{280} = \frac{\epsilon_{280}}{MW}$$

**Formel 10: Berechnung des spezifischen Extinktionskoeffizienten  $^{0,1\%}A_{280}$ .**  
 $^{0,1\%}A_{280}$  spezifischer Extinktionskoeffizient bei 280 nm [ $cm^2/mg$ ]  
 $MW$  Molekulargewicht des Proteins [ $g/mol$ ]

Damit kann mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes (Formel 11) die Proteinkonzentration durch Extinktionsmessung bei 280 nm bestimmt werden.

$$A_{280} = ^{0,1\%}A_{280} \cdot c \cdot d$$

$$\rightarrow c = A_{280} / (^{0,1\%}A_{280} \cdot d)$$

**Formel 11: Berechnung der Proteinkonzentration mit Hilfe des spezifischen Extinktionskoeffizienten  $^{0,1\%}A_{280}$ .**

$A_{280}$  gemessene Absorption bei 280 nm  
 $c$  Konzentration [ $mg/ml$ ]  
 $d$  Schichtdicke der Küvette [ $cm$ ]  
 $^{0,1\%}A_{280}$  spezifischer Extinktionskoeffizient bei 280 nm [ $cm^2/mg$ ]

Es wurden Spektren von 220–350 nm aufgenommen, wobei sich das Absorptionsmaximum des Proteins bei 278 nm befinden sollte. Der Quotient  $A_{280}/A_{250}$  sollte mindestens 1,8 betragen und es sollte keine Absorption oberhalb von 300 nm auftreten, um eine Verfälschung des Ergebnisses durch auf Aggregatbildung zurückgehende Lichtstreuung ausschließen zu können. Bei deutlicher Absorption oberhalb von 300 nm wurde als erste Näherung eine lineare Zunahme der

Lichtstreuung mit abnehmender Wellenlänge angenommen und die ermittelte Proteinkonzentration entsprechend korrigiert.

In Tabelle 1 sind die molaren Extinktionskoeffizienten, Molekulargewichte und spezifischen Extinktionskoeffizienten der in dieser Arbeit verwendeten Proteine und niedermolekularen Substanzen zusammengefasst. Für Proteinvarianten wurden die entsprechenden Koeffizienten stets neu berechnet.

**Tabelle 1: Extinktionskoeffizienten und molare Masse (MW) der verwendeten Proteine und Substrate bzw. Liganden.**

Protein /Substrat	Molarer Extinktionskoeffizient $\epsilon_{(nm)}$ [ $M^{-1}cm^{-1}$ ]	MW [g/mol]	Spezifischer Extinktionskoeffizient $^{0,1\%}_{A_{280}}$ [cm/mg]
HisA	$\epsilon_{280}$ : 12950	27031	0,48
HisF	$\epsilon_{280}$ : 11500	27718	0,41
HisAF (ohne HisTag)	$\epsilon_{280}$ : 14440	27989	0,52
HisAF (mit HisTag)	$\epsilon_{280}$ : 14440	29195	0,49
HisFA (ohne HisTag)	$\epsilon_{280}$ : 9970	26755	0,37
HisFA (mit HisTag)	$\epsilon_{280}$ : 9970	27962	0,36
yPRT (Dimer)	$\epsilon_{280}$ : 38390	41372	0,93
TrpF (Dimer)	$\epsilon_{280}$ : 29400	49600	0,64
TrpC	$\epsilon_{280}$ : 22585	28674	0,78
ProFAR = PrFAR	$\epsilon_{300}$ : 6069	-	-
ProFAR – AICAR	$\Delta\epsilon_{300}$ : 5637	-	-
Anthranilsäure	$\epsilon_{310}$ : 2980	-	-
rCdRP	$\epsilon_{327}$ : 3430	-	-

### 3.5.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine werden durch das Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und negativ geladen. Dabei bindet SDS an das Protein gewöhnlich in einem Verhältnis von einem Molekül SDS pro 1,4 Aminosäureresten. Die Eigenladung des Proteins kann neben der Negativladung des mit SDS komplexierten Proteins vernachlässigt werden, so dass SDS-beladene Proteine identische Ladungs-Masse-Verhältnisse zeigen. Die Auftrennung beruht daher allein auf dem Siebeffekt, wobei die Laufgeschwindigkeit dem Logarithmus der Masse umgekehrt proportional ist (Laemmli 1970).

Tabelle 2 zeigt die Zusammensetzung der verwendeten 12,5 %igen SDS-Gele.

**Tabelle 2: Zusammensetzung 12,5 %iger SDS-PAGE Gele.**

Die Mengenangaben gelten für 13 Gele.

	<b>Trenngel (12,5 %)</b>	<b>Sammelgel (6 %)</b>
<b>Trenn-/Sammelgel-Puffer</b>	19,5 ml	7,38 ml
<b>Acrylamid-SL (30 %)</b>	26,2 ml	5,9 ml
<b>H<sub>2</sub>O</b>	31,58 ml	15,95 ml
<b>TEMED</b>	89 µl	29 µl
<b>APS (10%)</b>	195 µl	89 µl

Die Proben wurden 1:1 mit 2 x SDS-PAGE Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C inkubiert und kurz abzentrifugiert (EPPENDORF Centrifuge 5415D, 13.200 rpm, 30 s). Es wurden je 5–20 µl der Proben mit einer Hamiltonspritze in die Geltaschen gefüllt. Die Elektrophorese wurde bei 50 mA und 300 V durchgeführt und dauerte ca. 30 min. Anschließend wurden die Gele mit SDS-PAGE-Färbelösung gefärbt, wobei die Nachweisgrenze des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G250 200–500 ng Protein/mm<sup>2</sup> beträgt. Die Gele wurden 10 min in der Färbelösung geschwenkt und im Anschluss wurde durch wiederholtes Aufkochen in Wasser (Mikrowelle 900 W) die Hintergrundfärbung entfernt.

### 3.5.2.1 Vorbereitung der N-terminalen Sequenzierung

Das zu analysierende Protein wurde über SDS-PAGE aufgetrennt. Dazu wurde wie in 3.5.2 beschrieben vorgegangen, jedoch wurde ein Laufpuffer ohne Glycin verwendet. Anschließend wurde das Protein im Elektroblobverfahren auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Western Blotting Membran (ROCHE DIAGNOSTICS GmbH) übertragen (Towbin *et al.*, 1979).

Zur Anfärbung des geblotteten Proteins wurde die Membran für 2 min in die Färbelösung für die N-terminale Sequenzierung gelegt. Danach wurde die Membran in die Entfärbelösung überführt, bis der Hintergrund farblos war. Die Proteine waren noch als Banden sichtbar. Die Membran wurde an der Luft getrocknet und das ausgeschnittene Spaltungsprodukt in der Arbeitsgruppe von Prof. Rainer Deutzmann (Universität Regensburg) sequenziert. Die zyklische Sequenzierung erfolgte vollautomatisch an einem Sequenzer von Applied Biosystems nach der Methode von Edmann (Edman & Begg, 1967).



### 3.5.2.2 Analyse der Proteinlöslichkeit mittels SDS-PAGE

Zur Analyse der Proteinlöslichkeit von HisAF-Varianten wurden Expressionen im analytischen Maßstab durchgeführt (3.4.1), jedoch hier aus 10 ml LB Kulturvolumen in 50 ml Falcon-Gefäßen. Nach Induktion mit 0,5 mM IPTG bei einer OD<sub>600</sub> von 0,4–0,6 und Expression für 4 h bei 37 °C wurden die Zellen geerntet (EPPENDORF 5810R, 4.000 rpm, 10 min, 4 °C) und anschließend in 2 ml Aufschlusspuffer (100 mM KP, pH 7,5, 2 mM EDTA) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall für 20 s mit einer Amplitude von 20 % (Branson Sonifier W-250D, 4 °C). Die weitere Präparation der Proben erfolgte wie in 3.4.1 beschrieben.

Von der unlöslichen (P) und der löslichen (C) Zellfraktion wurden unterschiedliche Verdünnungen auf ein SDS Polyacrylamidgel aufgetragen und die Proteinbanden im Anschluss mit der Software OptiQuant (Version 02.50) analysiert.

Um Quantifizierungsfehler durch nichtlineare Färbung ausschließen zu können, wurden nur Banden mit ähnlicher Intensität verglichen. Das Verhältnis von unlöslich zu löslich exprimiertem Protein wurde anschließend durch Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung ermittelt. Pro HisAF-Variante wurden stets drei unabhängige Klone analysiert.

### 3.5.3 Analytische Gelfiltration

Mit Hilfe der analytischen Gelfiltration lässt sich das apparente Molekulargewicht und somit auch der Oligomerisierungszustand eines Proteins bestimmen. Bei der Trennung der Proteine besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Elutionsdauer und dem Logarithmus des Molekulargewichtes. Es wurde die Säule Superdex 75 (GE HEALTHCARE) mit einem Säulenvolumen von 24 ml an der Chromatografie-Anlage ÄKTA Basic 10 better (GE HEALTHCARE) verwendet. Auf die mit 50 mM KP, 300 mM KCl, pH 7,5 äquilibrierte Säule wurden 100–500 µl Proteinlösung einer Konzentration von 0,2–3 mg/ml über einen Superloop aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einer Flussrate von 0,5 ml/min und wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt. Mit Hilfe einer Kalibrierungsgerade, die mit Proteinen bekannter Größe ca. alle 4–5 Wochen neu erstellt wurde, wurde das apparente Molekulargewicht (MW<sub>app</sub>) der analysierten Proteine ermittelt.

### 3.5.4 Fluoreszenz-Spektroskopie

Die intrinsische Fluoreszenz eines Proteins beruht auf den aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, wobei in der Regel die Tryptophanfluoreszenz dominiert. Sowohl die Intensität der Fluoreszenzemission als auch die Lage des Emissionsmaximums hängen stark von der unmittelbaren Umgebung des Chromophors ab. Liegt das Protein denaturiert vor und sind somit die Seitenketten der Tryptophane lösungsmittel exponiert, ist eine Rotverschiebung zu beobachten (Schmid, 1997): Ein vollständig denaturiertes Protein hat ein Emissionsmaximum bei 350 nm, während ein nativ gefaltetes Protein mit abgeschirmten Tryptophanen ein Emissionsmaximum zwischen 320 und 330 nm aufweist.

Die Messungen wurden am Fluoreszenz-Spektrophotometer Cary Eclipse (Varian, Darmstadt) in einer vierseitig geschliffenen Quarzküvette durchgeführt. Die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm (Tryptophan- und Tyrosinfluoreszenz) oder 295 nm (nur Tryptophanfluoreszenz) angeregt und das emittierte Signal in einem Bereich von 300 bis 450 nm aufgenommen.

### 3.5.5 Bestimmung der Proteinstabilität mittels chemischer Denaturierung

Zur Untersuchung der Stabilität von Proteinen gegenüber chaotropen Reagenzien wurde natives Protein unterschiedlichen Konzentrationen an Denaturierungsmittel ausgesetzt. In dieser Arbeit wurde stets Harnstoff verwendet, dessen denaturierende Wirkung seit über 100 Jahren bekannt ist und genutzt wird (Spiro, 1900; Ramsden, 1902). Es wurde aus einer Proteinlösung, einer Pufferstammlösung (50 mM KP, pH 7,5) und einer hochkonzentrierten Harnstoff-Lösung (10 M Urea in 50 mM KP, pH 7,5) eine Messreihe mit gleich bleibender Proteinkonzentration (4,5–5,5  $\mu$ M) und ansteigenden Harnstoffkonzentrationen von 0–8 M erstellt. Die Auffaltungsexperimente fanden stets bei Raumtemperatur statt. Die Einstellung des Gleichgewichts zwischen nativem und aufgefaltetem Zustand des Proteins wurde durch Fluoreszenz-Spektroskopie (3.5.4) nach verschiedenen Zeitpunkten (12 h bis 48 h) überprüft. Sobald die Messpunkte sich nicht mehr veränderten, galt das Gleichgewicht als erreicht. Bei allen HisAF-Varianten war dies spätestens nach 20 h der Fall.

Nach Anregung der Fluoreszenz bei 280 nm wurde von den einzelnen Proben der Messreihe die relative Intensität der Emission bei derjenigen Wellenlänge gemessen,

bei der die Differenz zwischen nativem und vollständig denaturiertem Protein am größten war. Dies war in der Regel bei ca. 320 nm der Fall.

Jede Probe wurde 20 s lang im Fluoreszenz-Spektrofotometer vermessen und die erhaltenen Intensitäten gemittelt (Programm-Modul: Simple Reads). Die Messwerte wurden anschließend normiert und als Funktion der Konzentration an Denaturierungsmittel aufgetragen. Hierfür wurde der Zweizustands-Faltungsmechanismus angenommen, bei dem das Protein nur in der gefalteten ( $N$ ) oder ungefalteten ( $U$ ) Konformation vorliegen kann, Faltungsintermediate werden hierbei nicht berücksichtigt. Die Anteile an gefaltetem Protein ( $F_N$ ) und ungefaltetem Protein ( $F_U$ ) summiert sich damit zu:

$$F_N + F_U = 1$$

**Formel 12: Annahme einer Auffaltung nach dem Zweizustands-Modell**

Damit lässt sich jeder Signalwert  $y$  durch Formel 13 beschreiben.

$$y = y_N \cdot F_N + y_U \cdot F_U$$

**Formel 13: Zweizustands-Modell bezogen auf die Messwerte der Auffaltung.**

$y_N$  und  $y_U$  stellen den für  $N$  bzw.  $U$  (bei der jeweiligen Konzentration an Denaturierungsmittel) typischen Signalwert dar.

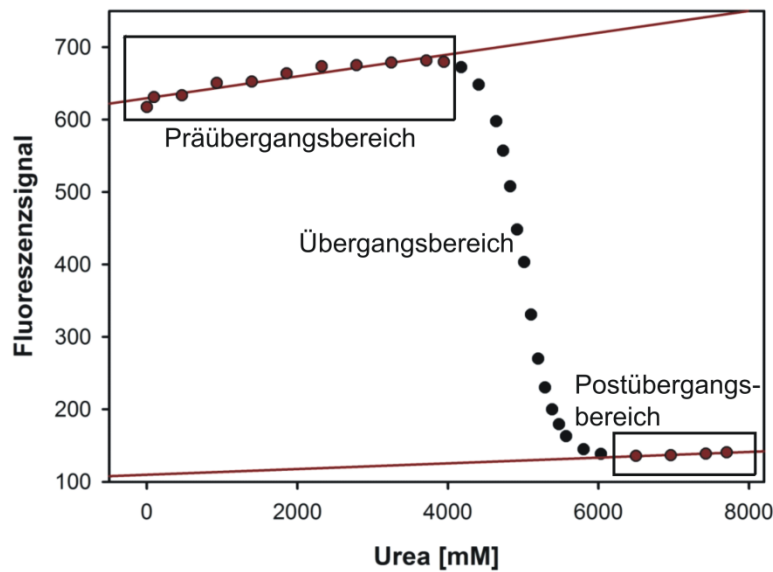
Durch Kombination von Formel 12 und Formel 13 ergibt sich für  $F_U$ :

$$F_U = \frac{(y_N - y)}{(y_N - y_U)}$$

**Formel 14: Bestimmung des Anteils an ungefaltetem Protein aus den bei einem Auffaltungsexperiment gemessenen Signalintensitäten.**

$F_U$	Fraktion an ungefaltetem Protein
$y_N$	Signalwert von vollständig nativem Protein
$y_U$	Signalwert von vollständig denaturiertem Protein
$y$	Messwert

Die Änderung der  $y$ -Werte im Prä- bzw. Postübergangsbereich zeigt die Abhängigkeit von  $y_N$  bzw.  $y_U$  von der Denaturierungsmittelkonzentration an. Diese Abhängigkeit war annähernd linear, weshalb sich  $y_N$  und  $y_U$  für jede Konzentration an Denaturierungsmittel durch lineare Regression bestimmen ließen. Dazu wurde eine Ausgleichsgerade durch die Datenpunkte im Prä- sowie im Postübergangsbereich gelegt (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Schematische Darstellung der Auswertung eines Auffaltungsexperiments.**

Die Werte stammen aus fluoreszenzspektroskopischen Messungen; die eingetragenen Bereiche markieren den Prä- sowie den Postübergangsbereich. Rot gekennzeichnet sind solche Punkte, die bei der Regression des Prä- und Postübergangsbereichs berücksichtigt wurden.

Mit Hilfe der ermittelten Geradengleichungen im Prä- und Postübergangsbereich wurde für jede Denaturierungsmittelkonzentration der theoretische Signalwert von nativem ( $F_N$ ) und ungefaltetem Protein ( $F_U$ ) bestimmt. Anschließend wurde für jeden Messwert gemäß Formel 14 der Anteil an ungefaltetem Protein ( $F_U$ ) berechnet.

Aus den daraus resultierenden normierten Werten kann aus dem Übergangsbereich der Denaturierung die freie Enthalpie der Auffaltung berechnet werden. Dazu wird zunächst die Gleichgewichtskonstante  $K$  bei verschiedenen Denaturierungsmittelkonzentrationen nach Formel 15 ermittelt.

$$K = \frac{U}{N} = \frac{F_U}{F_N} = \frac{F_U}{1 - F_U}$$

**Formel 15: Berechnung der Gleichgewichtskonstante unter Annahme des Zweizustands-Modells.**

Zur Berechnung der freien Enthalpie  $\Delta G$  nach Formel 16 werden nur K-Werte von 0,1–10 verwendet, um den Fehler zu minimieren (Pace & Scholtz, 1997).

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K$$

**Formel 16: Bestimmung der freien Gibbs-Energie-Änderung mit Hilfe der Gleichgewichtskonstanten.**

$R$  allgemeine Gaskonstante ( $8,314 \text{ J}_{(\text{mol} \cdot \text{K})}$ )  
 $T$  absolute Temperatur (298 K)

Aus Formel 17 geht hervor, dass zwischen  $\Delta G$  und der Harnstoffkonzentration ein linearer Zusammenhang besteht.

$$\Delta G = \Delta G(H_2O) - m[Urea]$$

**Formel 17: Abhängigkeit der freien Auffaltungsenthalpie von der Konzentration an Harnstoff.**

$\Delta G(H_2O)$  freie Enthalpie der Auffaltung in Wasser [kJ/mol]  
 $m$  Steigung der Geraden [kJ/(mol·M)]

Trägt man die ermittelten  $\Delta G$ -Werte gegen die entsprechenden Denaturierungsmittelkonzentrationen auf und legt eine Ausgleichsgerade durch die Punkte, ist es möglich, durch Extrapolation die freie Enthalpie der Auffaltung in Wasser  $\Delta G(H_2O)$  ( $c = 0$  M Harnstoff) zu ermitteln. Sofern die Annahme des Zweizustands-Modells nicht durch deckungsgleiche Auffaltung von Tertiär- und Sekundärstruktur belegt ist, kann dieser Wert nur als apparent angegeben werden ( $\Delta G(H_2O)^{app}$ ). Zusätzlich ist die Auffaltung durch die Steigung  $m$  (bzw.  $m^{app}$ ) der Ausgleichsgeraden charakterisiert, die ein Maß für die Kooperativität der Auffaltung darstellt. Der Mittelpunkt des Übergangs wird durch den  $D_{1/2}$ -Wert beschrieben. Das ist diejenige Konzentration an Urea bei der  $F_N = F_U$ , also 50 % des untersuchten Proteins im denaturierten und 50 % im nativen Zustand vorliegen. Zwischen den verschiedenen Größen besteht folgende Beziehung (Formel 18):

$$D_{1/2} = \frac{\Delta G(H_2O)}{m}$$

**Formel 18: Berechnung des  $D_{1/2}$ -Wertes aus den Größen in Formel 17.**

### 3.5.6 Steady-state Enzymkinetik

#### 3.5.6.1 Kinetik von HisA und HisF

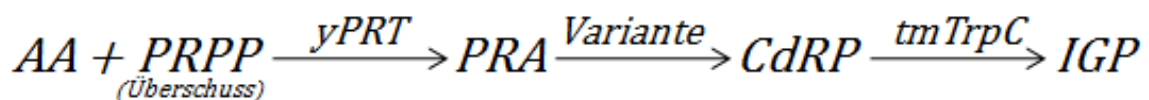
Die Messungen der HisA- und HisF-Aktivitäten wird mit einem gekoppelten Test durchgeführt, wobei die HisA-Reaktion der HisF-Reaktion vorangestellt ist (Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001; Henn-Sax *et al.*, 2002). Dies bedeutet, dass das HisF-Substrat PRFAR durch HisA als Hilfsenzym aus ProFAR *in situ* synthetisiert wird bzw. das HisA-Produkt PRFAR durch HisF als Hilfsenzym weiter umgesetzt wird. Die Kopplung der Reaktionen ist notwendig, weil (a) das HisF-Substrat PRFAR extrem labil ist und deshalb nicht isoliert gelagert werden kann und (b) die Umsetzung von ProFAR zu PRFAR, katalysiert durch HisA, spektroskopisch nicht detektierbar ist. Erst die von HisF katalysierte Umsetzung von PRFAR zu AICAR und

ImGP lässt sich durch einen Abfall der Absorption bei 300 nm verfolgen und mit  $\Delta\epsilon_{300}(\text{PRFAR-AICAR}) = 5,64 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  quantifizieren (Klem & Davisson, 1993).

Die Messungen wurden in einem Volumen von 1 ml bei RT in 50 mM HEPES, pH 8,0 in einer Quarzküvette an einem Cary 100 Spektrofotometer (Varian) durchgeführt. Alle Proben enthielten 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1  $\mu\text{M}$  des Hilfsenzym (HisA oder HisF) und 50  $\mu\text{M}$  ProFAR. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe der jeweils untersuchten Proteinvariante. ProFAR wurde nach einer Vorschrift von Davisson *et al.* (1994) enzymatisch hergestellt und gereinigt. Seine Konzentration wurde durch Absorptionsmessung bei 300 nm bestimmt:  $\epsilon_{300}(\text{ProFAR}) = 6,069 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Klem & Davisson, 1993). Der Quotient  $A_{290}/A_{260}$  gibt Auskunft über die Reinheit von ProFAR und beträgt idealerweise 1,24. Am Ende der Messung wurde durch Zugabe von HisAwt bzw. HisFwt das Substrat vollständig umgesetzt.

### 3.5.6.2 Kinetik von TrpF

Bei diesem Test wurde die Fähigkeit von HisA, HisF und HisAF-Varianten gemessen, das Substrat Phosphoribosylanthranilat (PRA) in das Produkt 2-carboxyphenylamino-1-desoxy-ribulose-5-phosphat (CdRP) umzusetzen. In der Tryptophanbiosynthese wird diese Reaktion von dem Enzym PRA-Isomerase (TrpF) katalysiert. Da PRA sehr instabil ist, wurde es *in situ* durch das Hilfsenzym Anthranilat-Phosphoribosyltransferase aus *S. cerevisiae* (yPRT) ausgehend von Anthranilsäure (AA) und Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) synthetisiert. Dabei wurde mit einem 30-fachen molaren Überschuss an PRPP gearbeitet, um in AA (und Ribose-5-Phosphat) zerfallenes PRA zu regenerieren (Hommel *et al.*, 1995). Zusätzlich wurde, zur Verhinderung von Produktinhibition durch sich anhäufendes CdRP, ein Überschuss des Enzyms Indolglyzerolphosphatsynthase aus *T. maritima* (tmTrpC) zugesetzt, welches CdRP zu Indolglycerolphosphat (IGP) umsetzt:



Die Messungen wurden in 50 mM HEPES, pH 7,5, 4 mM EDTA ( $\text{E}_4$ ), 2 mM DTT ( $\text{D}_2$ ) und 4 mM  $\text{MgCl}_2$  bei 25 °C an einem Fluoreszenzspektrometer Cary Eclipse (VARIAN), in einer vierseitig geschliffenen Küvette durchgeführt. Die Fluoreszenz wurde bei 350 nm angeregt und die Emission bei 400 nm aufgenommen (PMT: 600–700 Volt; Spaltbreite bei Exzitation und Emission jeweils 5 nm). Zunächst wurde AA

in Konzentrationen zwischen 1 und 300  $\mu\text{M}$  vorgelegt, zusammen mit einem 30-fachen molaren Überschuss an PRPP und 2,5  $\mu\text{M}$  TrpC. Durch Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  yPRT wurde PRA aus AA und PRPP synthetisiert, was zu einer Abnahme der gemessenen Fluoreszenzintensität führte. Nachdem sich eine konstante Basislinie eingestellt hatte, wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 bis 50  $\mu\text{M}$  der jeweiligen Variante ( $[E_0]$ ) gestartet. Der Fortschritt der Reaktion, d. h. die Umwandlung von PRA zu CdRP bzw. IGP, konnte durch eine weitere Abnahme der Fluoreszenzintensität verfolgt werden. Um diejenige Fluoreszenzintensität zu ermitteln, die 0  $\mu\text{M}$  PRA entspricht, wurde die Reaktion falls nötig nach einem geeigneten Zeitpunkt durch die Zugabe von TrpF aus *T. maritima* (tmTrpF) abgeschlossen. Aus der Analyse der Anfangssteigungen wurden die Anfangsgeschwindigkeiten  $v_i$  bei den verschiedenen PRA-Konzentrationen bestimmt.

Von den HisAF<sub>com1</sub>-III und einzelnen HisA-Varianten wurden jeweils mindestens drei unabhängige Sättigungskurven aufgenommen. Die aus den hyperbolischen Fits ermittelten Werte für  $k_{\text{cat}}$  ( $V_{\text{max}}/[E_0]$ ) und  $K_M^{\text{PRA}}$  wurden jeweils gemittelt und davon die Standardabweichungen bestimmt. Aus den Parametern  $k_{\text{cat}}$  und  $K_M^{\text{PRA}}$  wurde die katalytische Effizienz  $k_{\text{cat}}/K_M^{\text{PRA}}$  bestimmt und ebenfalls der Mittelwert gebildet. Die Standardabweichung der katalytischen Effizienz  $k_{\text{cat}}/K_M^{\text{PRA}}$  wurde nach Formel 19 berechnet.

$$\Delta R = \sqrt{\left((\Delta a/a)^2 + (-\Delta b/b)^2\right)} \cdot a/b$$

**Formel 19: Berechnung der Standardabweichung der katalytischen Effizienz  $k_{\text{cat}}/K_M^{\text{PRA}}$  nach dem Gaußschen Fehlerfortpflanzungsgesetz.**

$\Delta R$	Standardabweichung der katalytischen Effizienz $k_{\text{cat}}/K_M^{\text{PRA}}$
$\Delta a$	Standardabweichung der gemessenen $k_{\text{cat}}$ -Werte
$a$	Mittelwert der aus einem hyperbolischen Fit abgeleiteten $k_{\text{cat}}$ -Werte
$\Delta b$	Standardabweichung der gemessenen $K_M^{\text{PRA}}$ -Werte
$b$	Mittelwert der aus einem hyperbolischen Fit abgeleiteten $K_M^{\text{PRA}}$ -Werte

### 3.5.7 Ligandenbindung

#### 3.5.7.1 Bindung von ProFAR an TrpF-aktive HisA- und HisAF-Varianten

Die Bindung von ProFAR, dem Substrat von HisA, an HisAF und HisA-Varianten konnte durch die Messung der kompetitiven Inhibition ihrer TrpF-Aktivität (3.5.6.2) bestimmt werden. Dazu wurde eine PRA-Sättigungskurve in Gegenwart von 50  $\mu\text{M}$  ProFAR (bei HisAF-Varianten) und 5  $\mu\text{M}$  ProFAR (bei HisA-Varianten) aufgenommen

und anschließend aus dem ermittelten apparenten  $K_M^{\text{app}}$  der  $K_i^{\text{ProFAR}}$  (entspricht  $K_d^{\text{ProFAR}}$ ) bestimmt (Formel 20).

$$K_M^{\text{app}} = K_M \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \rightarrow K_i = \frac{K_M \cdot [I]}{K_M^{\text{app}} - K_M}$$

**Formel 20: Bestimmung des  $K_i$ -Wertes für ProFAR aus den Michaelis-Konstanten  $K_M^{\text{PRA}}$  und  $K_M^{\text{PRA,app}}$ .**

$K_M^{\text{app}}$     apparente Michaelis-Konstante in Anwesenheit von ProFAR  
 $K_M$        Michaelis-Konstante in Abwesenheit von ProFAR  
 $I$          Konzentration von ProFAR [ $\mu\text{M}$ ]  
 $K_i$        Inhibitionskonstante für ProFAR

### 3.5.7.2 Bindung von rCdRP

Reduziertes CdRP (rCdRP) ist ein Substratanalogon von TrpC und ein Produktanalogon von TrpF (Bisswanger *et al.*, 1979), dessen Bindung über Förster-Transfer (Fluoreszenzenergietransfer) von intrinsischer Tryptophanfluoreszenz auf das aromatische Ringsystem von rCdRP verfolgt werden kann (Bisswanger *et al.*, 1979). Durch Titration von TrpF aus *E. coli* und *T. maritima* mit rCdRP konnte die thermodynamische Bindungskonstante  $K_d$  ermittelt werden (Hommel *et al.*, 1995; Henn-Sax *et al.*, 2002; Sterner *et al.*, 1996). Analog wurden Titrationsen von HisA- und HisAF-Varianten mit rCdRP durchgeführt.

Die Konzentration von rCdRP wurde durch Absorptionsmessung mit  $\epsilon_{327}(\text{rCdRP}) = 3,42 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ermittelt. Der Quotient  $A_{252}/A_{278}$  gibt Auskunft über die Reinheit von rCdRP. Für sauberes rCdRP liegt er bei 25 (Bisswanger *et al.*, 1979).

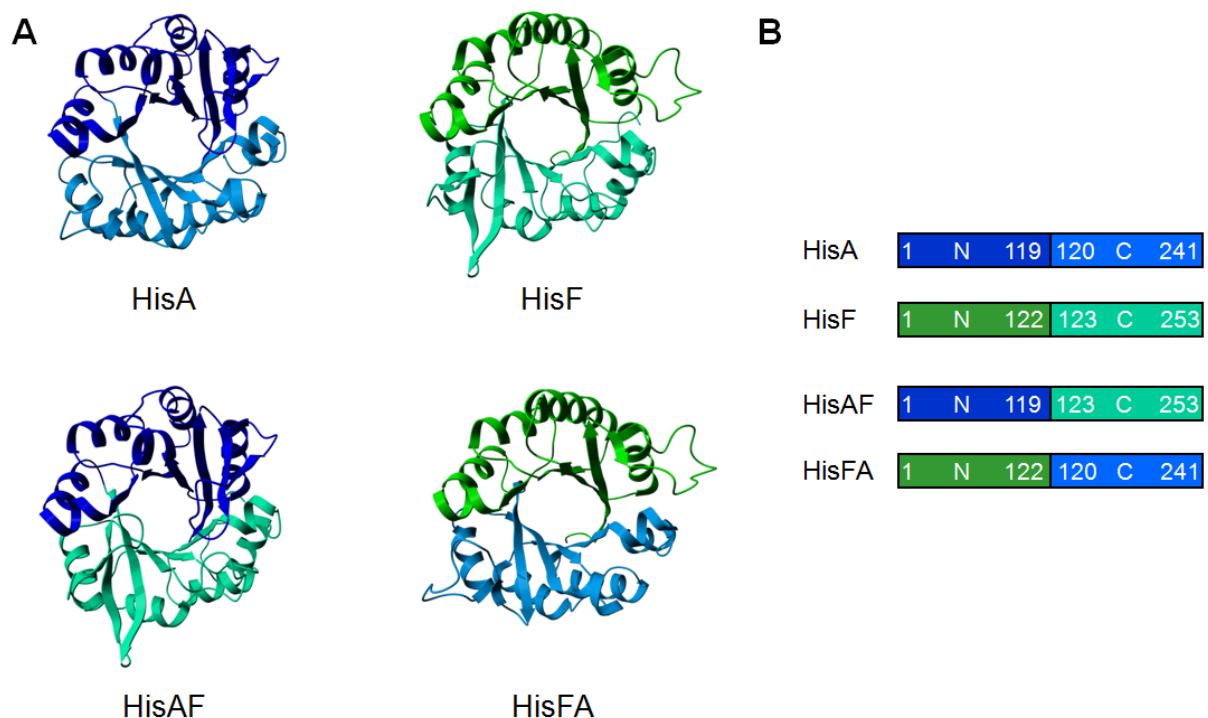
Die Messungen wurden in einem Volumen von 1 ml bei RT in 50 mM HEPES, pH 7,5 in einer vierseitig geschliffenen Quarzküvette an einem Cary ECLIPSE Fluoreszenz-Spektrometer (Varian) durchgeführt. Es wurden 5  $\mu\text{M}$  der jeweiligen HisA oder HisAF-Variante vorgelegt und mit rCdRP in Schritten von 1–40  $\mu\text{M}$  titriert. Nach jedem Titrationsschritt wurde 30 s gewartet und anschließend nach Anregung bei 280 nm ein Emissionsspektrum von 300 bis 450 nm aufgenommen (Programm-Modul Scan). Mit zunehmender rCdRP Konzentration nahm die Tryptophanfluoreszenz von HisAF bei 320 nm und von HisA bei 340 nm ab, während die rCdRP-Fluoreszenz bei ca. 415 nm anstieg. Die Fluoreszenzintensität bei 320 nm (HisAF-Varianten) bzw. 340 nm (HisA-Varianten) wurde über 20 s gemittelt (Programm-Modul Simple Reads) und nach Abzug des Nullwerts (Enzym in Puffer) gegen die rCdRP-Konzentration aufgetragen. Durch einen Computerfit der resultierenden hyperbolischen Bindungskurve (Sigma Plot) wurde  $K_d^{\text{rCdRP}}$  berechnet.

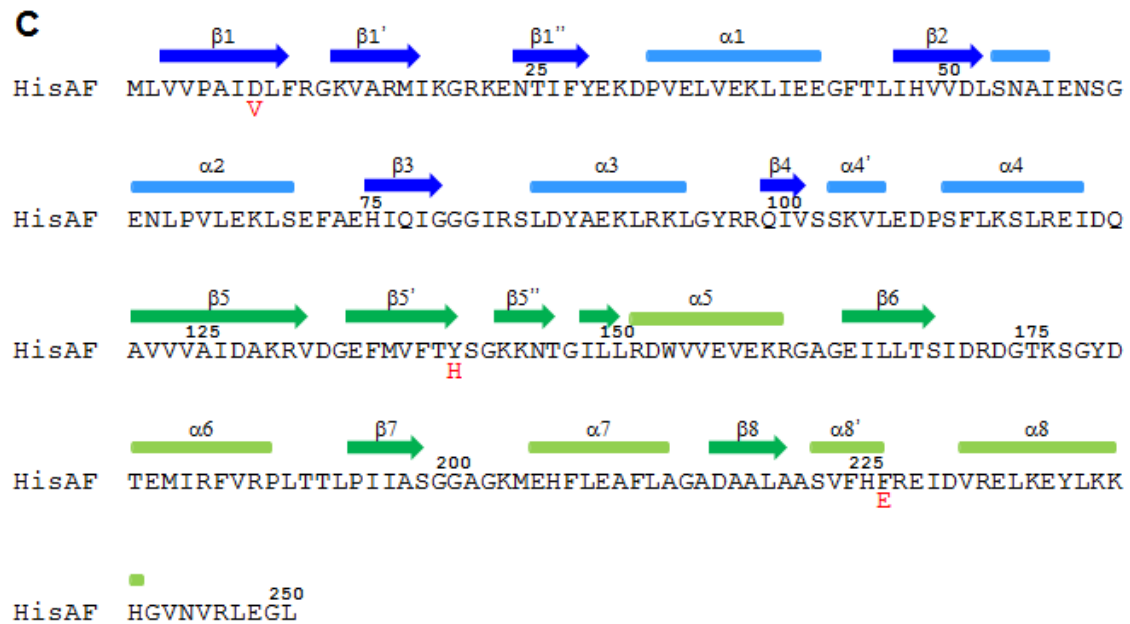


## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Herstellung von chimären Proteinen aus den $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzymen HisA und HisF

Die Betrachtung von  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzymen lässt vermuten, dass diese durch divergente Evolution aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein hervorgegangen sind (1.4) und dieses durch Tandemduplikation und Fusion eines  $(\beta\alpha)_4$ -Halbbarrels entstanden ist (Sternier & Höcker, 2005). Unklar ist, ob als möglicher weiterer Evolutionsmechanismus eine Rekombination von verschiedenen  $(\beta\alpha)_4$ -Halbbarrel-Proteinen angenommen werden kann. Um diese Frage zu klären, wurden chimäre Proteine aus den  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzymen HisA und HisF hergestellt werden (Abbildung 12). Sollte es gelingen, auf HisAF und / oder HisFA katalytische Aktivität zu etablieren, dann wäre dies ein starker Hinweis darauf, dass  $(\beta\alpha)_4$ -Halbbarrels unabhängig evolvierende Domänen darstellen.





**Abbildung 12: N- und C-terminale Hälften der  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyme HisA (blau) und HisF (grün) wurden wechselseitig zu den Chimären HisAF und HisFA kombiniert.**

**A:** Aufsicht auf den Katalysepol der  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyme HisA (pdb: 1qo2) und HisF (pdb: 1thf) sowie der daraus gebildeten Chimären HisAF und HisFA (Computermodele wurden von Martin Ostermeier, Lehrstuhl Biochemie II, Universität Regensburg, durch Homologie-Modellierung mit MODELLER erstellt). Die N-terminalen Hälften sind dunkel, die C-terminalen Hälften sind hell gefärbt.

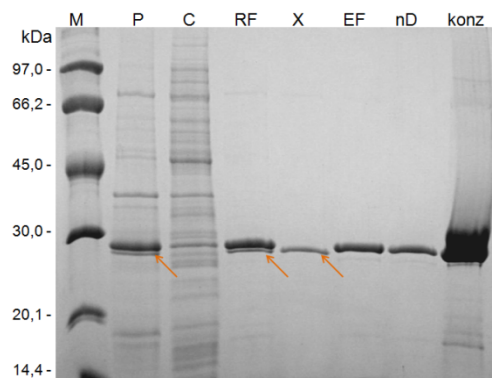
**B:** Schematische Darstellung der Elternenzyme HisA und HisF, sowie der daraus hergestellten Chimären HisAF und HisFA. Die Zahlen geben die flankierenden Reste der jeweiligen N- und C-terminalen Hälfte an.

**C:** Aminosäuresequenz mit Sekundärstrukturelementen von HisAF auf Basis der Homologie-Modellierung mit MODELLER (siehe A). Die Sekundärstrukturelemente von HisA sind in blau, die von HisF in grün dargestellt. Mutationen, die zur Erhöhung der Löslichkeit und der Stabilität beitragen, sind in rot gezeigt (D8V: 4.4; Y140H: 4.2.2; F226E: 4.2).

In Abbildung 12B ist dargestellt, dass die Nummerierung der Aminosäuren durch die Rekombination der N-terminalen Hälfte von HisA mit der C-terminalen Hälfte von HisF (HisAF) nur für die N-terminale Hälfte der des Elternenzym HisA entspricht. Ebenso entspricht in HisFA nur die Nummerierung der N-terminalen Hälfte der von HisF. Möchte man von einer Aminosäure im HisF-Teil von HisAF auf die entsprechende Aminosäure in HisF schließen, muss zur Aminosäurenummer „3“ hinzuaddiert werden (Beispiel: Asp173 in HisAF entspricht Asp176 in HisF). Um von einer Aminosäure im HisA-Teil von HisFA auf die entsprechende Aminosäure in HisA zu schließen, muss von der Aminosäurenummer „3“ subtrahiert werden (Beispiel: Leu153 in HisFA entspricht Leu150 in HisA).

## 4.2 Stabilisierung von HisAF durch rationales Design

Die biophysikalische Charakterisierung von HisAF war zu Beginn dieser Arbeit abgeschlossen (Höcker *et al.*, 2004). Um strukturelle Informationen für ein rationales Design hin zu erhöhter Stabilität und katalytischer Aktivität nutzen zu können, sollte die Kristallstruktur von HisAF in Kooperation mit Dr. Birte Höcker (Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Abteilung Proteinevolution, Tübingen), gelöst werden. Dazu wurde das in pET24a klonierte *hisAF*-Gen heterolog in *E. coli* T7 Express Rosetta Zellen bei 37 °C üN exprimiert und das rekombinante Protein aus der unlöslichen Zellfraktion gewonnen (3.4.1.3). Der nach der Rückfaltung erhaltene lösliche Überstand wurde über Blue Sepharose Affinitätschromatografie aufgereinigt (3.4.2.3), wodurch unter anderem vorhandene Abbaubanden von HisAF (HisAF-25; siehe unten) effizient entfernt werden konnten (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Reinigung von rekombinantem HisAF, dokumentiert über SDS-PAGE (12,5 % Polyacrylamid).**

M: Markerproteine mit molekularer Masse in kDa (*Low Molecular Weight* Marker von GE HEALTHCARE); P: unlösliche Zellfraktion; C: lösliche Zellfraktion; RF: Protein nach Rückfaltung aus der unlöslichen Fraktion; X: Durchlaufraktion der Reinigung über Blue Sepharose Affinitätschromatografie; EF: Hauptelutionsfraktion der Reinigung über Blue Sepharose Affinitätschromatografie; nD: Probe nach Dialyse; konz: konzentrierte Fraktion.

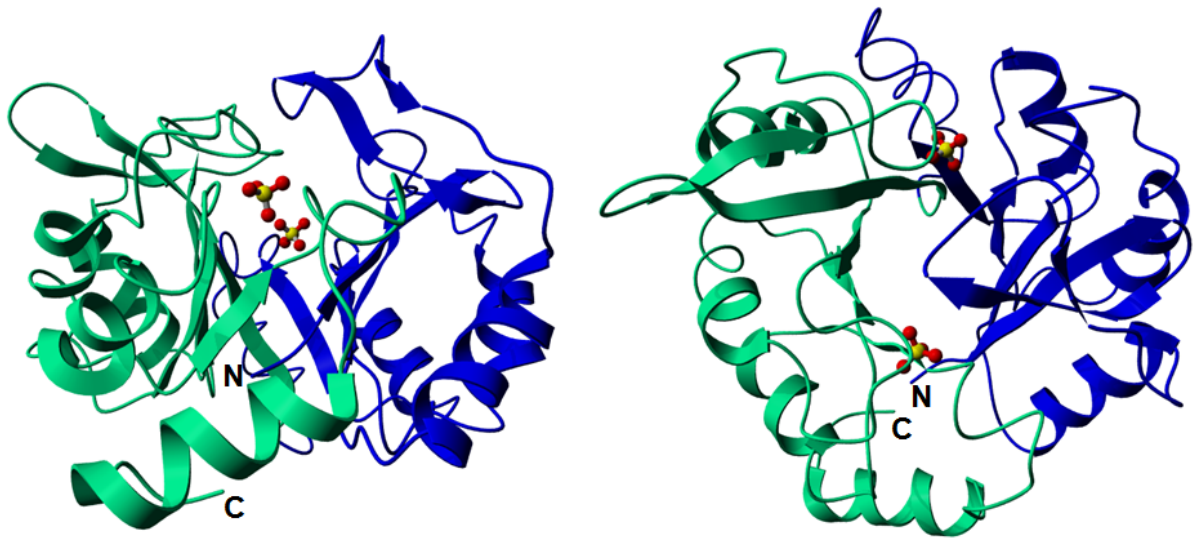
Die Pfeile deuten auf die Abbaubande von HisAF hin, die aus der Präparation entfernt werden konnte. Die Ausbeute aus einem Liter LB-Kulturmedium betrug ca. 60 mg Protein.

HisAF wurde auf 14,2 mg/ml einkonzentriert und in 50 mM KP, pH 7,5 zur Kristallisation zur Verfügung gestellt. Proteinkristalle wurden in 1,1 M Na-Malonat, 0,1 M HEPES, pH 7,0, 0,5 % ( $v/v$ ) Jeffamine ED-2001 erhalten (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Kristall von HisAF.**

Der Kristall hat die Zelldimension  $a=130$ ,  $b=224$ ,  $c=146$ ,  $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$  und lässt sich hinsichtlich der Symmetrie durch die Raumgruppe C222 beschreiben. Die erhaltenen Beugungsmuster erlaubten eine Aufklärung der Struktur bis zu einer Auflösung von  $4,0 \text{ \AA}$  (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Kristallstruktur von HisAF.**

Bänderdiagramm von HisAF mit einer Auflösung von  $4,0 \text{ \AA}$  in der Seitenansicht (links) und Aufsicht auf den Katalysepol (rechts). Die beiden gebundenen Phosphationen (Tetraeder) deuten auf ausgebildete Phosphatbindestellen hin. In dunkelblau ist die N-terminale Hälfte von HisA, in hellgrün die C-terminale Hälfte von HisF gezeigt. Der Durchmesser des zentralen Barrels beträgt wie für HisA und HisF etwa  $14 \text{ \AA}$ .

Die Abbildung macht deutlich, dass HisAF eine  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Struktur ausbildet und über funktionelle Phosphatbindestellen verfügt. Aufgrund der geringen Auflösung können jedoch keine Aussagen über die Lage der Aminosäureseitenketten getroffen werden, weshalb auch keine Anhaltspunkte für ein rationales Design in Hinblick auf Stabilisierung oder Aktivierung erhalten wurden.

In Abbildung 13 ist zu erkennen, dass sich bei der heterologen Genexpression von HisAF (und seiner Varianten) in *E. coli* stets eine schwache Proteinbande bei ca.  $25 \text{ kDa}$  (HisAF-25) unterhalb des gewünschten Proteins bei ca.  $27 \text{ kDa}$  (HisAF) befand. Dabei unterschied sich die Intensität dieser Bande stark zwischen den

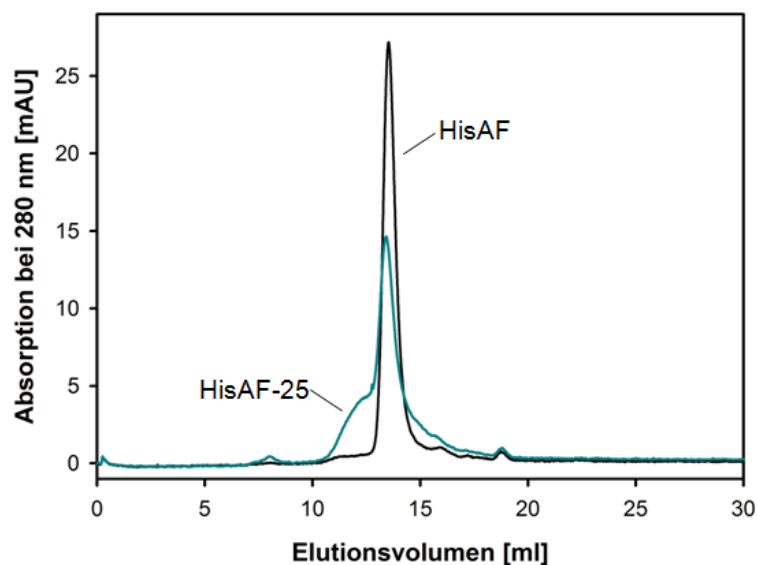
verschiedenen HisAF-Varianten. Weiterhin wurde im Falle löslicher Expression von HisAF-Varianten beobachtet, dass diese zusätzliche Bande in der löslichen Zellfraktion stärker auftrat als in der unlöslichen Fraktion, was auf einen proteolytischen Abbau schließen ließ. Die beiden HisAF-Spezies konnten über Red bzw. Blue Sepharose Affinitätschromatografie voneinander getrennt werden. Sie wurden anschließend jeweils einzeln auf ein SDS-Gel aufgetragen, durch Western Blotting auf eine PVDF-Membran übertragen und anschließend N-terminal sequenziert (Prof. Rainer Deutzmann, Universität Regensburg; 3.5.2.1). Es wurden folgende Sequenzen erhalten:

HisAF:        M L V V P A I D L F

HisAF-25:    M I X G X X E N T I

Die Sequenz von HisAF entspricht den erwarteten zehn N-terminalen Resten. In HisAF-25 konnten die 3., 5. und 6. Aminosäure nicht bestimmt werden (X), da aufgrund der geringen Proteinmenge relativ schwache Signale erhalten wurden. Der Vergleich mit der HisAF-Sequenz (Abbildung 12C) zeigt jedoch eindeutig, dass es sich um die auf Arg16 folgende Sequenz handelt. Entgegen der Erwartung eines proteolytischen Abbaus von HisAF C-terminal von Arg21, wie er bereits für HisA beobachtet werden konnte (Schwander 1997), erfolgt in HisAF die Proteolyse somit C-terminal von Arg16.

Vergleichend zu HisAF wurde eine analytische Gelfiltration mit HisAF-25 zur Bestimmung des Assoziationszustands durchgeführt (Abbildung 16).



**Abbildung 16: Analytische Gelfiltration von HisAF und HisAF-25.**

Es wurden jeweils ca. 200 µg Protein auf eine Superdex-75 Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte bei RT in 50 mM KP, pH 7,5, 300 mM KCl, und wurde bei 280 nm verfolgt. Aus der Eichgeraden der Säule

wurde für HisAF (Elution: 13,54 ml) ein apparentes Molekulargewicht von 29,6 kDa und für den dominierenden Peak von HisAF-25 (Elution: 13,42 ml) ein apparentes Molekulargewicht von 31,5 kDa berechnet.

In Abbildung 16 ist zwar eine Tendenz zu höhermolekularen Aggregaten für HisAF-25 erkennbar, dennoch liegen mehr als 50 % des Proteins als definiertes Monomer vor.

Zur Analyse der Tertiärstruktur von HisAF und HisAF-25 wurde Fluoreszenzemissionsspektroskopie (3.5.4) durchgeführt, deren Ergebnisse in Tabelle 3 gezeigt sind.

**Tabelle 3: Fluoreszenzemissionsmaxima von HisAF und HisAF-25.**

<b>Protein</b>	<b>F<sub>295</sub>-Maximum [nm]<sup>a</sup></b>	<b>F<sub>280</sub>-Maximum [nm]<sup>b</sup></b>
HisAF	325	319
HisAF-25	329	328

Pufferbedingungen: 50 mM KP, pH 7,5, 25 °C mit jeweils 5 µM HisAF bzw. HisAF-25.

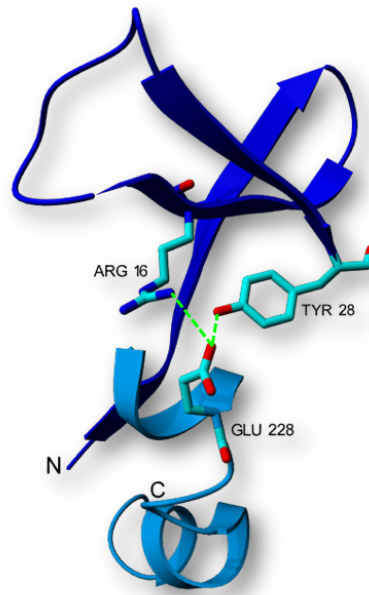
<sup>a</sup>: Lage des Fluoreszenzmaximums nach Anregung bei 295 nm

<sup>b</sup>: Lage des Fluoreszenzmaximums nach Anregung bei 280 nm

Der einzige Tryptophanrest Trp153 zeigt in HisAF-25 im Vergleich zu HisAF eine Rotverschiebung, was auf stärkere Lösungsmittelexposition hindeutet (Tabelle 3).

Insgesamt scheint HisAF-25 jedoch eine definierte Struktur einzunehmen, obwohl die ersten 16 Aminosäuren von HisAF fehlen und somit der gesamte  $\beta$ -Strang 1 und vier der sechs Aminosäuren von  $\beta$ -Strang 1' nicht vorhanden sind (Abbildung 12C). Es wäre denkbar, dass sich der verbliebene  $\beta$ -Strang 1'' als  $\beta$ -Strang 1 im zentralen *Barrel* positioniert.

Aufgrund der Beobachtung, dass in HisAF proteolytischer Abbau hinter Arg16 erfolgt, wurde dieser Bereich in der Röntgenstruktur von HisA näher analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass die positiv geladene Seitenkette von Arg16 aus  $\beta$ -Strang 1' mit der negativ geladenen Seitenkette von Glu228 aus  $\alpha$ -Helix 8' eine Salzbrücke ausbildet (Abbildung 17).

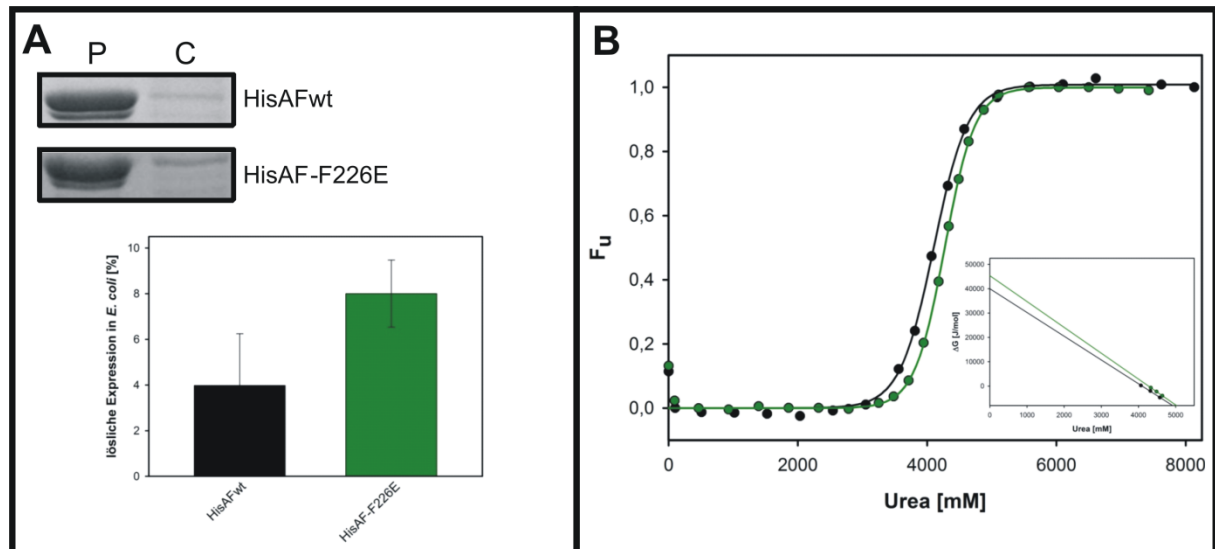


**Abbildung 17: Salzbrückenbindung zwischen Arg16 und Glu228 in HisA.**

Die Termini von HisA sind durch „N“ und „C“ markiert. Neben der Salzbrückenbindung zwischen Arg16 ( $\beta$ -Strang 1') und Glu228 ( $\alpha$ -Helix 8') wird zusätzlich eine Wasserstoffbrücke zwischen Tyr28 ( $\beta$ -Strang 1'') und Glu228 ausgebildet. Die Farbkodierung der Sekundärstrukturelemente entspricht der von HisA in Abbildung 12.

Ein strukturbasiertes Sequenzalignment von HisA und HisAF mit dem Programm DaliLite ergab, dass sich an Stelle von Glu228 in HisA der Rest Phe226 in HisAF befindet. Da dessen phenolische Seitenkette nicht zur Ausbildung einer Salzbrückenbindung mit Arg16 befähigt ist, wurde Phe226 gegen Glutamat ausgetauscht, wodurch die Salzbrückenbindung wiederhergestellt werden und somit eine Stabilisierung von HisAF erfolgen sollte. Dazu wurde das Gen *hisAF-F226E* durch PCR mit den Primern 5'*hisA-NdeI* und 3'*hisF-F229E* amplifiziert, mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *NotI* in pET21a kloniert und das rekombinante Protein aus dem löslichen Zellextrakt von *E. coli* T7 Express Zellen mittels Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie (3.4.2.2) gereinigt. Das Ergebnis der Löslichkeitssanalyse und der Auffaltung von HisAF-F226E in Harnstoff ist in Abbildung 18 dargestellt.





**Abbildung 18: Vergleich der Löslichkeiten (A) und der konformationellen Stabilität (B) von HisAF-F226E mit HisAFwt.**

**A oben:** Unlösliche (P) und lösliche (C) Fraktionen von *E. coli* T7 Express Rosetta Zellen mit den rekombinanten Proteinen (SDS-Gel; 12,5 % Polyacrylamid; gefärbt mit Commassie-blau).

**A unten:** Prozentanteil der löslich hergestellten Proteine, jeweils als Mittelwert aus der Analyse von drei verschiedenen Klonen. Proteinbanden aus einer SDS-Gel Analyse der Proteine wurden fotografiert und ihre Intensitäten mittels OptiQuant bestimmt (3.5.2.2).

**B:** Auffaltung der Proteine in Harnstoff. Die Messungen wurden in 50 mM KP, pH 7,5 bei 25 °C durchgeführt. Die Proben einer Messreihe enthielten 4,5 bis 5,5  $\mu$ M Protein. Das fluorimetrische Signal wurde über 15 s aufgenommen und gemittelt. Die Anregung erfolgte bei 280 nm und die Emission wurde bei 317 nm verfolgt. Die durchgezogenen Linien sollen das Auge führen. Inset: Bestimmung der thermodynamischen Stabilität  $\Delta G(H_2O)$  durch Extrapolation der Daten aus dem Übergangsbereich auf [Urea] = 0 M unter Annahme des Zweizustandsmodells (3.5.5). Die Qualität der Regressionsgeraden betrug für die gezeigten Varianten  $R^2 > 0,99$ . Die ermittelten  $\Delta G(H_2O)$ -Werte sind in Tabelle 4 aufgelistet. Die Farbcodierung entspricht der aus (A).

Abbildung 18A zeigt, dass durch den Austausch F226E eine Verbesserung der Proteinlöslichkeit von ca. 4 % auf 8 % erreicht werden konnte. Zusätzlich gewinnt HisAF-F226E leicht an Stabilität, was sich in der Erhöhung des  $D_{1/2}$ -Wertes um 0,2 M Harnstoff und in einem  $\Delta\Delta G^{app}$ -Wert von -5,4 kJ/mol ausdrückt (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Vergleich der Stabilität von HisAFwt und HisAF-F226E nach Denaturierung in Harnstoff.**

HisAF-Variante	$m^{app}$ [kJ/(mol·M)]	$[D]_{1/2}$ [M]	$\Delta G^{app}(H_2O)$ [kJ/mol]	$\Delta\Delta G^{app}$ [kJ/mol]
wt	9,7 (8,6) <sup>a</sup>	4,1 (4,0) <sup>a</sup>	39,9 (34,8) <sup>a</sup>	0,0
F226E	10,6	4,3	45,3	-5,4

$m^{app}$  und  $\Delta G^{app}(H_2O)$  wurden unter Annahme des Zweizustands-Modells ermittelt.

<sup>a</sup>: Daten aus Höcker (2002).

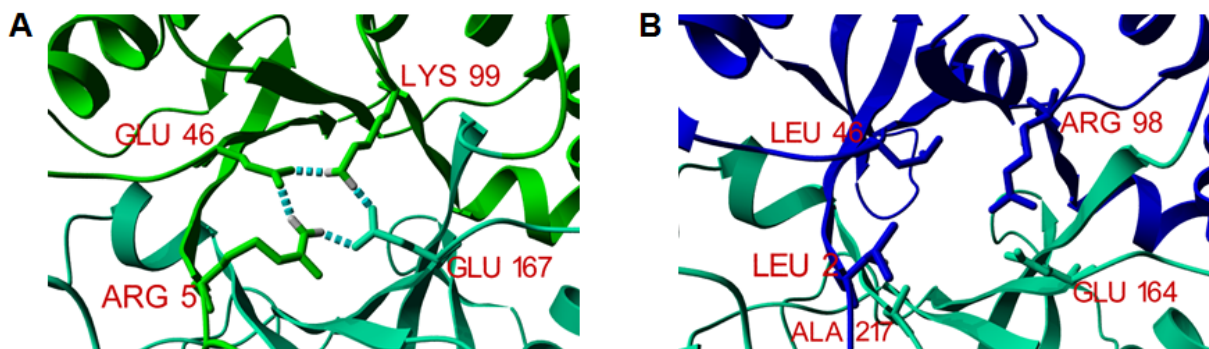
Der Beitrag von oberflächenexponierten Salzbrücken zur Stabilität von Proteinen wird in der Literatur sehr kontrovers diskutiert. Es existieren Beispiele bei denen oberflächenexponierte Salzbrücken nur wenig stabilisierend wirken (Horovitz *et al.*,



1990; Serrano *et al.*, 1990; Lyu *et al.*, 1992) und andere, bei denen sie einen wesentlichen Beitrag zur Stabilität leisten (Vetriani *et al.*, 1998; Spek *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 1999). Der für HisAF-F226E gemessene Beitrag zur Proteinstabilität von 5,4 kJ/mol steht im Einklang zu Ergebnissen von Takano *et al.* (2000), die einen Beitrag von oberflächenexponierten Salzbrücken zur Proteinstabilität von 3–9 kJ/mol ermitteln konnten.

#### 4.2.1 Stabilisierung von HisAF durch Rekonstruktion eines Salzbrückenclusters

In HisF konnte bei der Analyse der Struktur (pdb: 1thf) ein Salzbrückencluster beobachtet werden, das sich im zentralen *Barrel* am Stabilitätspol befindet. Dieses Cluster besteht aus den Aminosäuren Arg5, Glu46 und Lys99 aus der N-terminalen Hälfte von HisF sowie Glu167 aus der C-terminalen Hälfte von HisF (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Blick auf das Salzbrückencluster von HisF am Stabilitätspol (A) und die entsprechende Konstellation in HisAF (B).**

A: Die N-terminale Hälfte mit den Resten Arg5, Glu46 und Lys99 von HisF ist dunkelgrün, die C-terminale Hälfte mit Glu167 ist hellgrün gefärbt. Die Salzbrücken sind in cyan dargestellt.

B: Die N-terminale Hälfte von HisAF ist in blau, die C-terminale Hälfte ist in hellgrün dargestellt. Positionen, die nach Mutation Teil eines Salzbrückenclusters in HisAF werden könnten, sind dargestellt: Leu2, Leu46 und Arg98 aus der N-terminalen Hälfte, sowie Glu164 (entspricht Glu167 aus HisF) und Ala217 (entspricht Ala220 aus HisF) aus der C-terminalen Hälfte.

Die Farbcodierung der Sekundärstrukturelemente entspricht der von HisF und HisAF in Abbildung 12.

Dieses Salzbrückencluster wurde bereits erfolgreich bei der Herstellung von HisF-C<sup>\*</sup>C, wo zwei C-terminale Hälften von HisF miteinander fusioniert sind, rekonstruiert (Höcker *et al.*, 2004). Dazu wurden in HisF-C<sup>\*</sup>C in der N-terminalen Hälfte die Mutationen A124R und A220K eingeführt. Da Glu167 bereits in beiden Hälften vorhanden war, sollte das Salzbrückencluster durch diese beiden positiv geladenen Aminosäuren vervollständigt werden. Tatsächlich war HisF-C<sup>\*</sup>C deutlich kompakter als HisF-CC (Höcker *et al.*, 2004); die Ausbildung des rekonstruierten

Salzbrückenclusters konnte durch die Röntgenstruktur bestätigt werden (Lochner, 2008).

Zur Stabilisierung von HisAF wurde ein analoger Ansatz verfolgt. In Abbildung 19B sind die Reste aus der N-terminalen HisA- und der C-terminalen HisF-Hälfte gezeigt, die nach entsprechender Mutation Teil des Salzbrückenclusters werden könnten. Für die Position, die in HisF von Arg5 besetzt wird, kommen die Positionen Leu2 und Ala217 in Frage. Von der Symmetrie des Modells her würde eine positive Ladung an Position 217 am ehesten ins zentrale Fass ragen, jedoch entspricht auf der Basis eines Sequenzalignments (nicht gezeigt) der Rest Leu2 in HisAF am ehesten dem Arg5 von HisF (Abbildung 19). An Position von Glu46 aus HisF findet sich in HisAF der Rest Leu46. Die Position Lys99 in HisF wird von Arg98 in HisAF bereits äquivalent besetzt.

Zur Stabilisierung von HisAF wurden folgende *hisAF*-Gene mittels PCR durch Wahl geeigneter Primer amplifiziert und in pET21a kloniert:

A *hisAF*-L2R+L46E

B *hisAF*-L46E+A217R/K

C *hisAF*-*Ins*.[M+L+A]+M1K+L2R (*Ins.* = Insertion)

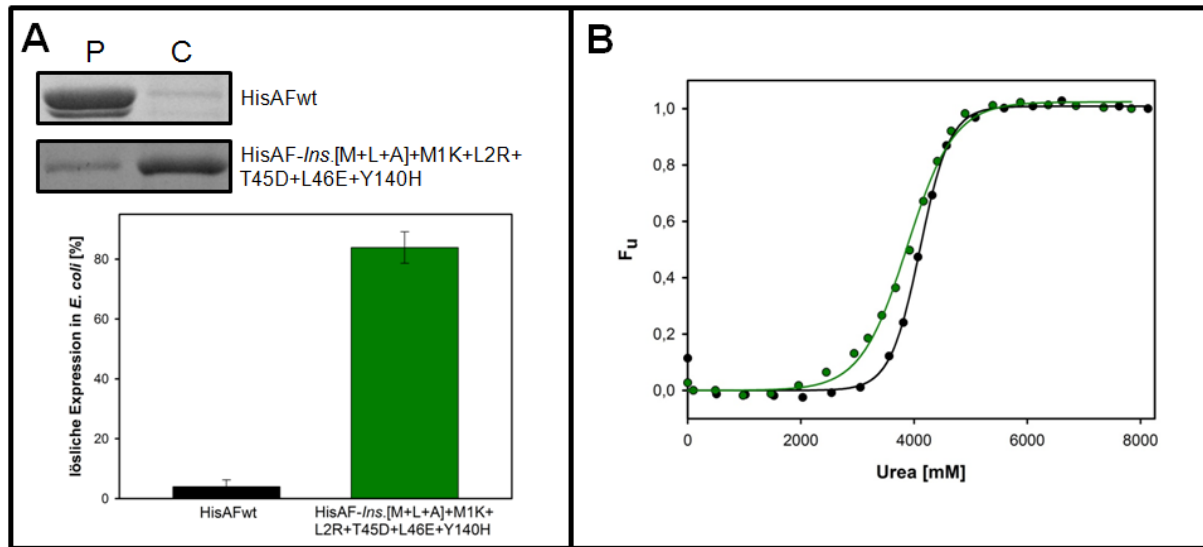
Bei Variante „C“ wurden die ersten fünf Aminosäuren von HisF (Met1, Leu2, Ala3, Lys4 und Arg5) unter Substitution von Met1 und Leu2 von HisA vor *hisAF* kloniert (weitere Erläuterungen siehe 4.8.1). Nach Expression und Reinigung der rekombinanten Proteine konnte für keine der hergestellten Varianten eine Stabilisierung beobachtet werden. Bei der Auffaltung in Harnstoff verringerte sich der  $D_{1/2}$ -Wert von 4,1 M für HisAF auf bis zu 2,5 M für HisAF-L46E+A217R (Daten nicht gezeigt).

Eine weitere Analyse der HisF-Struktur zeigte, dass der konservierte Rest Asp45 in *loop*  $\alpha 1\beta 2$  eine Salzbrücke zu Lys238 in  $\alpha$ -Helix 8 ausbildet. Um die Ausbildung einer analogen Salzbrücke in HisAF zu ermöglichen, wurden Thr45 und Leu46 gegen negativ geladene Reste ausgetauscht und folgende Variante hergestellt:

HisAF-*Ins*.[M+L+A]+M1K+L2R+T45D+L46E+Y140H (Y140H: siehe 4.2.2)

Die Klonierung der Variante erfolgte durch PCR auf dem Templat pET21a-*hisAF*-Y140H (4.2.2) sowie den endständigen Genprimern 5'*hisA*-*Ins*.[M+L+A]+M1K+L2R und 3'*hisF*-*NotI*, wodurch die Mutationen *Ins*.[M+L+A]+M1K+L2R eingeführt wurden. In das resultierende Konstrukt, welches über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *NotI* in pET21a kloniert wurde, wurden mittels OE-PCR, den Mutagenisierungs-

primern 5'- und 3'*hisA*-T45D+L46E sowie den flankierenden Primern 5'T7 Promotor und 3'*hisF*-*NotI* die Austausche T45D und L46E eingebracht. Die Expression erfolgte in *E. coli* T7 Express Rosetta Zellen und die Reinigung von HisAF-*Ins*. [M+L+A]+M1K+L2R+T45D+L46E+Y140H erfolgte mittels Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie. Die Variante wurde hinsichtlich ihrer Löslichkeitseigenschaften und ihrer konformationellen Stabilität in Harnstoff untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 gezeigt.



**Abbildung 20: Vergleich der Löslichkeiten (A) und der konformationellen Stabilität (B) von HisAF-*Ins*. [M+L+A]+M1K+L2R+T45D+L46E+Y140H mit HisAFwt.**

**A oben:** Unlösliche (P) und lösliche (C) Zellfraktionen von *E. coli* T7 Express Rosetta Zellen mit den rekombinanten Proteinen (SDS-Gel; 12,5 % Polyacrylamid; gefärbt mit Commassie-blau).

**A unten:** Prozentanteil der löslich hergestellten Proteine, jeweils als Mittelwert aus der Analyse von drei verschiedenen Klonen. Proteinbanden aus einer SDS-Gel Analyse der Proteine wurden fotografiert und ihre Intensitäten mittels OptiQuant bestimmt (3.5.2.2).

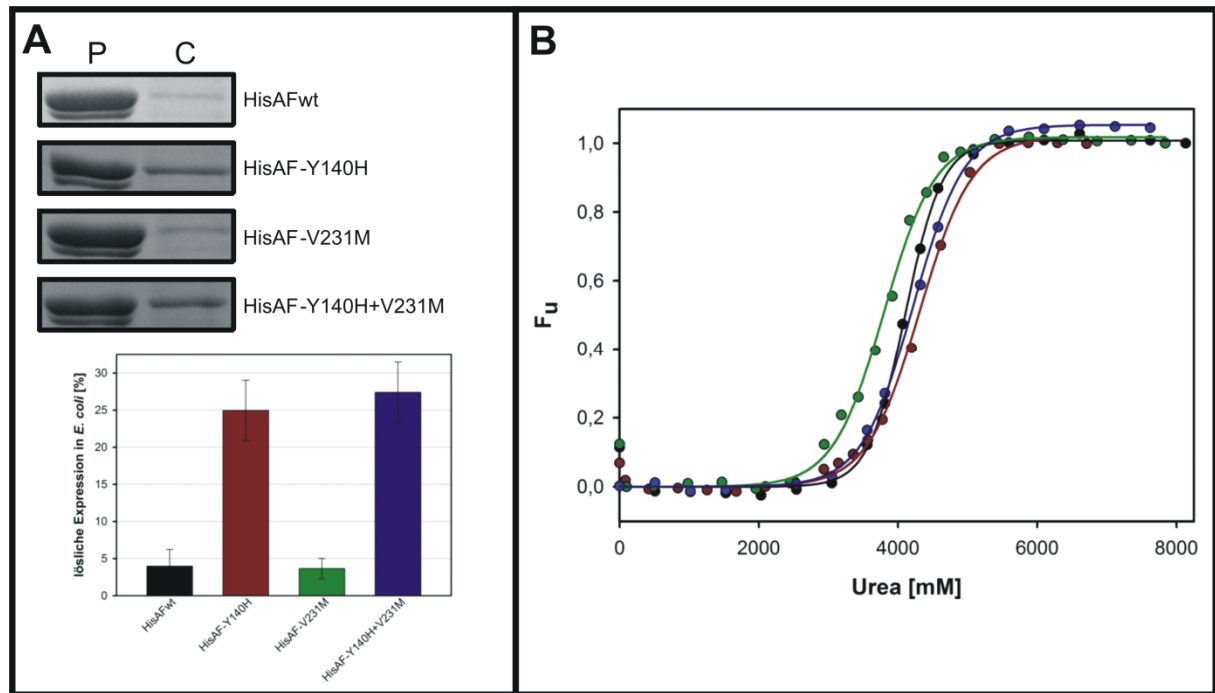
**B:** Auffaltung der Proteine in Harnstoff. Die Messungen wurden in 50 mM KP, pH 7,5 bei 25 °C durchgeführt. Die Proben einer Messreihe enthielten 4,5 bis 5,5  $\mu$ M Protein. Das fluorimetrische Signal wurde über 15 s aufgenommen und gemittelt. Die Anregung erfolgte bei 280 nm und die Emission wurde bei 317 nm verfolgt. Die durchgezogenen Linien sollen das Auge führen. Die Farbcodierung entspricht der aus (A).

Abbildung 20A macht deutlich, dass es durch die genannten Austausche zu einer deutlichen Verbesserung der Löslichkeit von HisAF um einen Faktor 20 auf über 80 % kommt. Die erhöhte Löslichkeit geht jedoch einher mit einem leichten Verlust an konformationeller Stabilität und Kooperativität der Auffaltung (Abbildung 20B), was sich im Vergleich zu HisAFwt (vgl. Tabelle 4) in der Verringerung des  $[D]_{1/2}$ -Wertes (3,9 M) sowie des  $m^{app}$ -Wertes (8,2 kJ/(mol·M)) ausdrückt.

#### 4.2.2 HisAF-Y140H+V231M

Das in Kapitel 4.2.1 beschriebene Konstrukt HisF-C\*C konnte parallel zu dieser Arbeit durch Mutationen weiter optimiert werden. Bei diesen, in der N-terminalen Hälfte liegenden Austauschen, handelt es sich um Y143H und V234M; die entsprechende Variante wurde HisF-C\*\*C genannt (Seitz *et al.*, 2007). Durch Übertragung der Austausche in die identische C-terminale Hälfte von HisF-C\*\*C konnte die Löslichkeit und Stabilität weiter erhöht und die Kristallstruktur der resultierenden Variante HisF-C\*\*\*C gelöst werden (Lochner, 2008). Anhand dieser Struktur ist klar erkennbar, dass der Rest Y143H solvensexponiert vorliegt, was die verbesserte Löslichkeit von HisF-C\*\*C und HisF-C\*\*\*C erklärt. Demgegenüber kann der Effekt des Austauschs V243M anhand der Kristallstruktur noch nicht hinreichend erklärt werden. Es wird jedoch vermutet, dass es zu einem van-der-Waals Kontakt des Methionins mit den in der angrenzenden Hälfte liegenden Resten Trp156, Val160, Arg163, Gly164 und Ala165 kommt (Seitz *et al.*, 2007).

Aufgrund der positiven Effekte der beiden Austausche Y143H und V234M in HisF-C\*\*C bzw. HisF-C\*\*\*C wurden diese einzeln und in Kombination in die HisF-Hälfte von HisAF übertragen. Die Klonierung von *hisAF-Y140H* erfolgte mittels OE-PCR auf dem Templat pET24a-*hisAF*, wobei die Mutagenisierungsprimer 5'- und 3'*hisF-Y143H* in Kombination mit den endständigen Genprimern 5'*hisA-NdeI* und 3'*hisF-NotI* verwendet wurden. Zur Herstellung von *hisAF-Y140H+V231M* wurde mittels PCR und dem Templat pET21a-*hisAF-Y140H* ein 3'Megaprimer durch 5'*hisF-V234M* und 3'T7 Terminator hergestellt, welcher in einer zweiten PCR mit gleichem Templat und 5'*hisA-NdeI* zur Amplifikation von *hisAF-Y140H+V231M* diente. Die Herstellung von *hisAF-V231M* erfolgte, indem aus *hisAF-Y140H+V231M* der Austausch Y140H mittels OE-PCR und den Amplifikationsprimern 5'- und 3'*hisF-Y143* sowie der endständigen Genprimer 5'*hisA-NdeI* und 3'*hisF-NotI* wieder entfernt wurde. Die Klonierung der drei Konstrukte erfolgte in pET21a über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *NotI*, gefolgt von der Expression der Proteine HisAF-Y140H, HisAF-V231M und HisAF-Y140H+V231M in *E. coli* T7 Express Rosetta Zellen. Die Variante HisAF-V231M wurde durch Rückfaltung aus der unlöslichen Zellfraktion gereinigt (3.4.1.3), während HisAF-Y140H und HisAF-Y140H+V231M aus der löslichen Fraktion mittels Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie (3.4.2.2) gereinigt wurde. Die Varianten wurden bezüglich Löslichkeit und Stabilität mit HisAFwt verglichen (Abbildung 21).



**Abbildung 21: Vergleich der Löslichkeiten (A) und der konformationellen Stabilität (B) von HisAF-Y140H, HisAF-V231M und HisAF-Y140H+V231M im Vergleich zu HisAFwt.**

**A oben:** Unlösliche (P) und lösliche (C) Zellfraktionen von *E. coli* T7 Express Rosetta Zellen nach Expression der rekombinanten Proteine (SDS-Gel; 12,5 % Polyacrylamid; gefärbt mit Commassie-blau).

**A unten:** Prozentanteil der löslich hergestellten Proteine, jeweils als Mittelwert aus der Analyse von drei verschiedenen Klonen. Proteinbanden aus einer SDS-Gel Analyse der Proteine wurden fotografiert und ihre Intensitäten mittels OptiQuant bestimmt (3.5.2.2).

**B:** Auffaltung der Proteine in Harnstoff. Die Messungen wurden in 50 mM KP, pH 7,5 bei 25 °C durchgeführt. Die Proben einer Messreihe enthielten 4,5 bis 5,5  $\mu$ M Protein. Das fluorimetrische Signal wurde über 15 s aufgenommen und gemittelt. Die Anregung erfolgte bei 280 nm und die Emission wurde bei 317 nm verfolgt. Die durchgezogenen Linien sollen das Auge führen. Die Farbcodierung entspricht der aus (A).

Abbildung 21 zeigt, dass sich durch den Austausch Y140H die Löslichkeit von HisAF von ca. 4 % auf 25 % erhöht. Analog zu HisF-C\*\*C (Seitz *et al.*, 2007) wird die Löslichkeit von HisAF durch den Austausch V231M nicht beeinflusst. Anders als in HisF-C\*\*C, konnte in HisAF die Stabilität durch den Austausch V231M nicht verbessert werden; es ist sogar eine leichte Destabilisierung zu beobachten. Dies kann damit zusammenhängen, dass der eingeführte Methioninrest in der angrenzenden HisA-Hälfte von HisAF in eine andere Umgebung hineinragt als es bei HisF-C\*\*C der Fall ist.

Um die Löslichkeit der ab Kapitel 4.6.3 diskutierten HisAF-Varianten zu steigern, wurde der Austausch Y140H über OE-PCR (3.3.7.2) in diese eingefügt. Bei manchen Varianten wurde zusätzlich der Austausch V231M eingebracht, da zum Zeitpunkt der Bearbeitung der diskutierten Varianten die leicht destabilisierende Wirkung von

V231M noch nicht bekannt war. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Präsenz von V231M keinen wesentlichen Einfluss auf die gewonnenen Ergebnisse hatte.

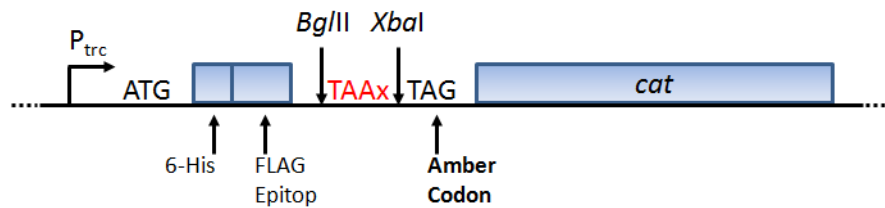
### 4.3 Stabilisierung von HisAF durch gerichtete Evolution

Rationale Ansätze zur Erhöhung der Stabilität und Löslichkeit von HisAF waren nur begrenzt erfolgreich verlaufen (4.2.1 und 4.2.2). Deshalb wurden zur Verbesserung der biophysikalischen Eigenschaften Ansätze der gerichteten molekularen Evolution verfolgt. Der Vorteil eines solchen Vorgehens ist, dass keine Informationen über die dreidimensionale Struktur des Proteins erforderlich sind und Erkenntnisse gewonnen werden können, die rational nicht zugänglich sind. Eine etablierte Methode zur Bestimmung bzw. Erhöhung der Löslichkeit und damit der Stabilität von Proteinen ist die Fusion des zu optimierenden Proteins an einen Selektions- bzw. *Screening*marker. Im Rahmen dieser Arbeit wurde als Selektionsmarker die Chloramphenicolacetyltransferase (CAT; Maxwell *et al.*, 1999; Seitz *et al.*, 2007) und als *Screening*marker das „grün fluoreszierende Protein“ (GFP; Waldo *et al.*, 1999; Pedelacq *et al.*, 2002) verwendet.

#### 4.3.1 Selektion auf stabilisierte HisAF-Varianten durch Fusion an die CAT

Die CAT (EC 2.3.1.28) ist ein sehr lösliches Protein mit einem Molekulargewicht von 25 kDa, das Homotrimere bildet und Zellen Chloramphenicolresistenz durch Acetyl-CoA abhängige Acetylierung der 3-Hydroxyl-Gruppe von Chloramphenicol verleiht. Es wurde nachgewiesen, dass die CAT in ihrer Funktion nicht eingeschränkt wird, wenn sie am C-Terminus von löslichen Proteinen fusioniert vorliegt (Robben *et al.*, 1993). Liegt das fusionierte Protein dagegen unlöslich in der Zelle vor, wird die CAT mit ausgefällt, wodurch das Ausmaß der Chloramphenicolresistenz ein Maß für die Löslichkeit des fusionierten Proteins darstellt. Dieses System wurde bereits erfolgreich zur Erhöhung der Löslichkeit und Stabilität mehrerer Proteine verwendet (Maxwell *et al.*, 1999; Sieber, 2003; Seitz *et al.*, 2007). Das von Maxwell *et al.* (1999) entwickelte Plasmid pCFN1 ist jedoch ungeeignet für die Selektion von Genbanken, da der verwendete *amber*-Suppressorstamm *E. coli* JM101 das Amber Stoppcodon TAG hinter der *Xba*I-Restriktionsschnittstelle im leeren pCFN1-Vektor überliert, die CAT exprimiert und den Zellen somit auch ohne *Insert* eine Resistenz gegen CAT-Konzentrationen von bis zu 500 µg/ml verleiht (Tabelle 5). Aus diesem Grund wurde

mittels QuickChange-PCR (3.3.7.3) zwischen die Restriktionsschnittstellen *Bgl*II und *Xba*I ein TAA-Stoppcodon und ein *Frameshift* eingefügt.



**Abbildung 22: Schematische Darstellung des modifizierten CAT-Fusions-Vektors pCFN1\_Stopp.**

TAA: eingefügtes Stoppcodon. x: *Frameshift*. Weitere Erläuterungen zu den gezeigten Elementen des Vektors sind Kapitel 2.2.6 zu entnehmen.

Durch die Einführung eines Stoppcodons und einer Basendeletion zwischen den Restriktionsschnittstellen konnte das Ablesen des Gens für die CAT ohne 5'-seitig kloniertes Gen zuverlässig verhindert werden (Tabelle 5).

**Tabelle 5: Wachstum transformierter *E. coli* JM101 Zellen auf LB-Platten in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von Chloramphenicol.**

Chloramphenicol [µg/ml]	<i>E. coli</i> JM 101 mit pCFN1	<i>E. coli</i> JM101 mit pCFN1_Stopp
50	+++	-
100	+++	-
300	+++	-
500	++	-

++ und +++: relatives Maß für die Anzahl und Größe der Kolonien; -: kein sichtbares Wachstum nach 16 h Inkubation bei 37 °C.

Zur Selektion auf HisAF-Varianten mit einer verbesserten Löslichkeit wurde eine durch Randomisierung des *hisAF*-Gens und anschließender Klonierung erzeugte pCFN1\_Stopp-*hisAF*-Genbank in den Löslichkeitstest nach Maxwell (1999; 3.2.9) eingesetzt. Dabei wurden die Chloramphenicolkonzentrationen der Selektionsplatten zwischen 50 und 500 µg/ml variiert. Das Ergebnis dieses Tests zeigt Tabelle 6.

**Tabelle 6: Wachstum transformierter *E. coli* JM101 Zellen auf LB-Selektionsplatten in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von Chloramphenicol.**

CAT-Fusionsprotein	Chloramphenicolkonzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]					
	50	100	200	300	400	500
pCFN1_Stopp ohne Insert	-	-	-	-	-	-
HisF	+++	+++	+++	+++	+++	+++
HisAF	+++	+++	+++	+++	+	-
HisAF-Genbank	+++	+++	+++	+++	++	++

+ bis +++: relatives Maß für die Anzahl und Größe der Kolonien. -: kein sichtbares Wachstum nach 16 h Inkubation bei 37 °C.

Tabelle 6 zeigt, dass HisAF bis zu einer Chloramphenicolkonzentration von 400  $\mu\text{g/ml}$  *E. coli* Zellen befähigt, sichtbare Kolonien auszubilden. Von den *E. coli* Zellen, die mit der HisAF-Genbank transformiert waren, wurden von den LB-Selektionsplatten mit 300, 400 und 500  $\mu\text{g/ml}$  Chloramphenicol jeweils 20 Kolonien für eine Kolonie-PCR (3.3.6) verwendet. Bei den insgesamt 60 durchgeführten Kolonie-PCRs wurden jedoch stets Fragmente erhalten, die wesentlich kürzer als erwartet waren, d. h., kein einziger Klon enthielt das Fusionsgen. Von zwei der 60 Klone wurde die DNA-Sequenz bestimmt (Abbildung 23).

```

pCFN1          5'-GAC AAG ATC TCA CGT CTA GAG TAG GCT C-3'
pCFN1_Stopp    5'-GAC AAG ATC TCA TAA GTC TAG AGT AGG CTC-3'
pCFN1_Stopp-R1 5'-GAC AAG ATC --- --- --- --- TAG GCT C-3'
pCFN1_Stopp-R2 5'-GAC AAG ATC --- --- --- --- --- GCT C-3'

```

**Abbildung 23: Multiple Klonierungsstelle von pCFN1, pCFN1\_Stopp sowie der Religanden R1 und R2 aus der Selektion auf HisAF-Varianten mit verbesserter Löslichkeit.**

Lücken stellen den Leserahmen dar. Blau: *Bgl*II Restriktionsschnittstelle; grün: *Xba*I Restriktionsschnittstelle; rot: eingeführtes TAA Stoppcodon; orange: TAG *amber*-Stoppcodon (durch eingeführten Frameshift in pCFN1\_Stopp außer Frame)

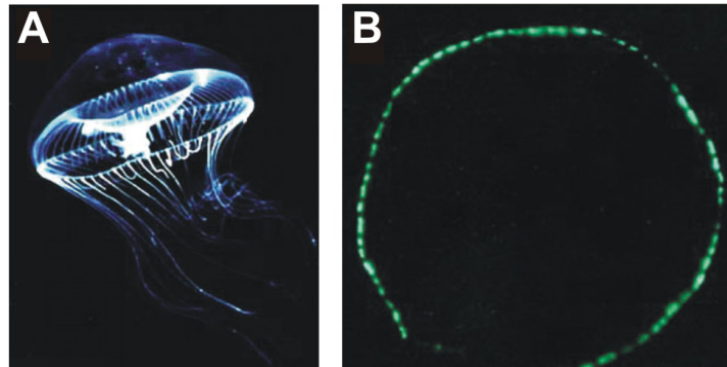
Abbildung 23 zeigt, dass es sich bei den analysierten Klonen um Religanden (R1 und R2) handelt, die sich unter Verlust des eingeführten TAA-Stoppcodons, des *Frameshifts* sowie der *Xba*I-Restriktionsschnittstelle gebildet hatten und somit die isolierte CAT *in frame* exprimierten.

Aufgrund dieses Ergebnisses und der Probleme, die in Seitz *et al.* (2007) im Zusammenhang mit diesem Selektionssystem diskutiert werden, wurde von dem CAT-System Abstand genommen und der Fokus auf ein *Screening* nach einer löslicheren HisAF-Variante durch Fusion mit GFP gelegt (Waldo *et al.*, 1999).



### 4.3.2 Screening nach einer stabilisierten HisAF-Variante durch Fusion an GFP

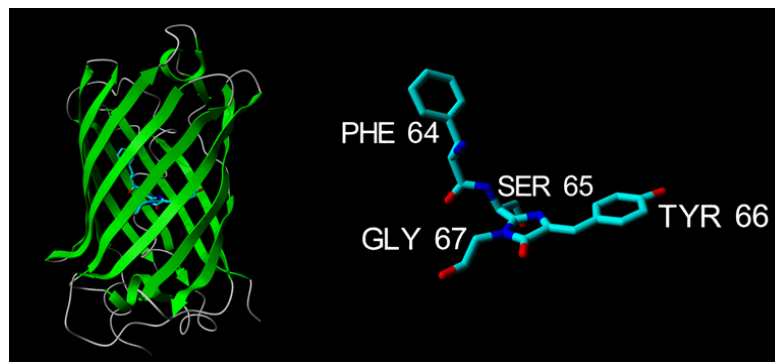
Ein anderes System zur Verbesserung der Löslichkeit und der Stabilität von Proteinen nutzt das „grün fluoreszierende Protein“ (GFP) aus der Kristallqualle *Aequorea victoria* als Reporterprotein (Abbildung 24).



**Abbildung 24: Die Biolumineszenz der Kristallqualle *Aequorea victoria*.**

Die Biolumineszenz der Kristallqualle *Aequorea victoria* (A) findet nur in einem schmalen, grün leuchtenden Ring am Rand des Schirms statt (B), wo sich das GFP in sogenannten photophoren Zellen befindet. Aus Veith & Veith (2005).

Dabei handelt es sich um ein 28 kDa großes Protein, das Licht mit einer Wellenlänge von 395 nm absorbiert und bei 509 nm sein Emissionsmaximum besitzt. Die Bildung des Chromophors von GFP, bestehend aus dem Tripeptid Ser65, Tyr66 und Gly67, ist ein autokatalytischer Prozess (Abbildung 25).



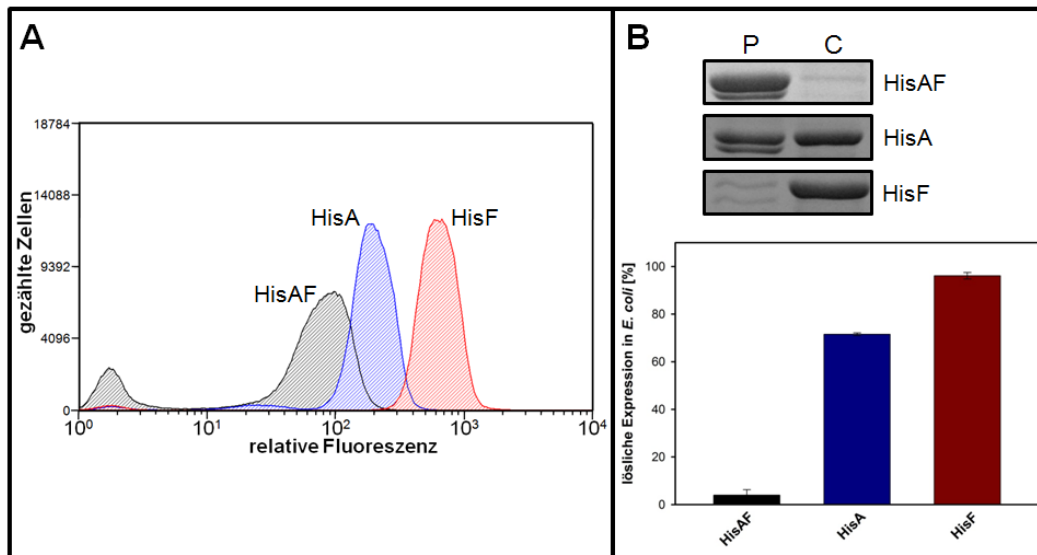
**Abbildung 25: Röntgenstruktur von GFP mit Chromophor bestehend aus Ser65, Tyr66 und Gly67.**

GFP (pdb: 1gfl) besteht aus einem elfsträngigen  $\beta$ -Barrel mit coaxialer  $\alpha$ -Helix im Inneren des Zylinders. Der erste Ring des Chromophors (p-Hydroxybenzylidenimidazolinon) wird durch eine autokatalytische Zyklisierung gebildet, wobei die Amidgruppe von Gly67 die Carbonylgruppe von Ser65 nukleophil angreift und anschließend  $\text{H}_2\text{O}$  abgespalten wird (=Imidazolinon). Durch  $\text{O}_2$  wird die  $\alpha$ - $\beta$ -Bindung von Tyr66 unter Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  dehydriert, wodurch die phenolische Seitenkette in Konjugation mit dem Imidazolinonring gebracht wird. In eGFP ist Phe64 zu Leucin und Ser65 zu Threonin mutiert.

Zur biotechnologischen Nutzung von GFP wurden zahlreiche GFP-Derivate entwickelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Variante des “*enhanced*” GFP (eGFP) verwendet, das u. a. die Austausche F64L und S65T enthält (Patterson *et al.*, 1997; Tsien, 1998). Durch diese beiden Austausche erfolgt eine Rotverschiebung der Anregungswellenlänge von 395 nm zu 488 nm, bei der die Fluoreszenz von eGFP mit Hilfe eines Argonlasers angeregt werden kann. Daneben trägt die verwendete eGFP-Variante die zusätzlichen Austausche F99S und M135T, welche die Faltungseigenschaften von GFP bei 37 °C verbessern und die Aggregationstendenz bei hohen Konzentrationen reduzieren (Yokoe & Meyer, 1996).

Zur Verbesserung der Stabilität und Löslichkeit von Proteinen werden diese an GFP N-terminal fusioniert. Die Ausbildung des GFP-Chromophors wird dabei durch das fusionierte Zielprotein beeinflusst. Ein lösliches Zielprotein behindert die Faltung von GFP und die Ausbildung des Chromophors nicht, während ein unlösliches Fusionsprotein den autokatalytischen Prozess zur Ausbildung des Chromophors erschwert und somit zu einer geringeren Fluoreszenzintensität führt. Dieser Effekt kann beim *Screening* von Genbanken durch FACS-Analysen (“*Fluorescence Activated Cell Sorting*”) genutzt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode neu am Lehrstuhl Biochemie II des Institutes für Biophysik und physikalische Biochemie der Universität Regensburg etabliert.

Um zu überprüfen, welches Fluoreszenzsignal *E. coli* Zellen liefern, die als Fusionsprotein HisAF-, HisA- oder HisF-GFP enthalten, wurden diese in einem Vorversuch mittels PCR unter Verwendung der Template pET24a-*hisAF*, pET21a-*hisA* sowie pET21a-*hisF* und der Amplifikationsprimer 5'*hisA*-*NdeI* bzw. 5'*hisF*-*NdeI* und 3'*hisA*-GFP (*NotI*) bzw. 3'*hisF*-GFP (*NotI*) in das Plasmid pER13a (2.2.2) kloniert, in *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS Zellen heterolog exprimiert und diese einer Analyse im FACS unterzogen (Abbildung 26).



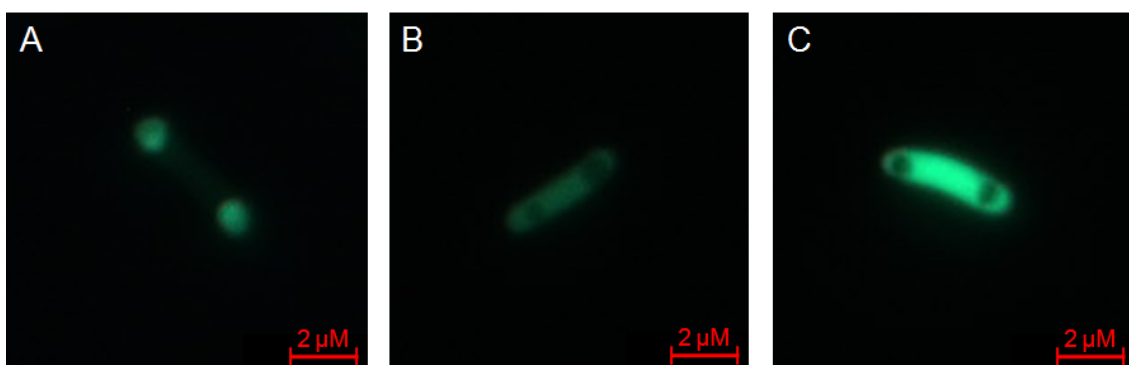
**Abbildung 26: Histogramme der FACS-Analyse von *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS Zellen mit GFP-Fusionen von HisAF, HisA und HisF (A) und Analyse der Löslichkeit der isolierten Proteine (B).**

**A:** Es sind die Histogramme von Zellen gezeigt, die HisAF-GFP, HisA-GFP und HisF-GFP exprimieren. Für jedes Histogramm wurden  $3 \cdot 10^5$  Zellen gezählt.

**B oben:** Unlösliche (P) und lösliche (C) Zellfraktionen von *E. coli* T7 Express Rosetta Zellen mit rekombinantem HisAF, HisA und HisF (SDS-Gel; 12,5 % Polyacrylamid; gefärbt mit Commassie-blau).

**B unten:** Prozentanteil der löslich hergestellten Proteine als Mittelwert aus der Analyse von drei verschiedenen Klonen pro Protein. Proteinbanden aus einer SDS-Gel Analyse der Proteine wurden fotografiert und ihre Intensitäten mittels OptiQuant bestimmt (3.5.2.2).

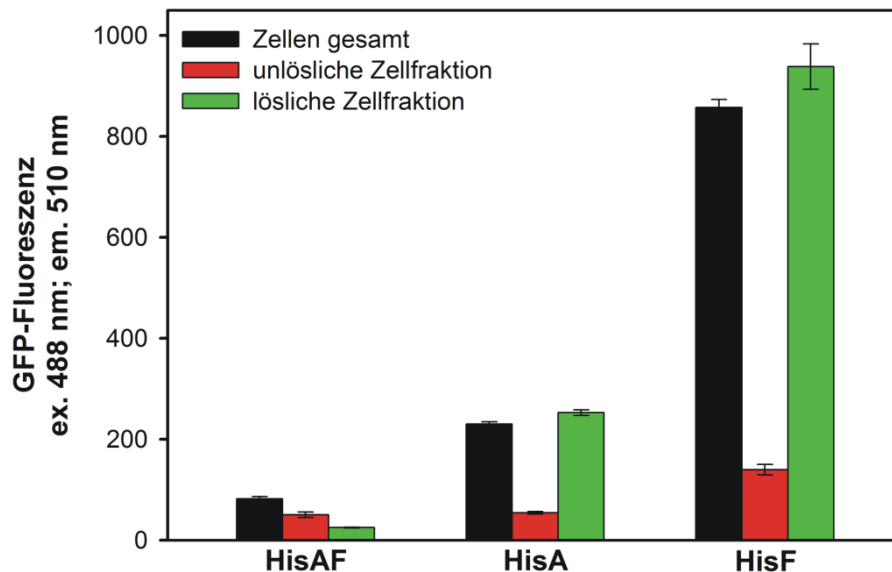
Die in Abbildung 26A dargestellten FACS-Histogramme der GFP-Fusionen spiegeln die Situation der drei Proteine nach heterologer Expression in *E. coli* Zellen in Abwesenheit von GFP wider (Abbildung 26B). Die Löslichkeit von HisF liegt über der von HisA, was sich in der stärkeren Fluoreszenz der Zellen ausdrückt. Bei HisAF handelt es sich um ein unlösliches Protein, was sich in der niedrigeren GFP-Fluoreszenz der Zellen widerspiegelt. Dieses Ergebnis bestätigte sich in einer mikroskopischen Analyse (Abbildung 27) und bei der Untersuchung der Zellen im Spektralfluorimeter (Abbildung 28).



**Abbildung 27: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS Zellen nach heterologer Expression von HisAF-GFP (A), HisA-GFP (B) und HisF-GFP (C).**

Pro Bild ist eine *E. coli*-Zelle gezeigt. Die Belichtungszeit betrug für (A) 4,0 s, für (B) und (C) jeweils 2,05 s. Weitere Einzelheiten finden sich im Text.

In Abbildung 27A erkennt man HisAF-GFP in unlöslicher Form als *inclusion bodies* an den Polen der Zelle. Demgegenüber stehen die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Abbildung 27B und C, in denen HisA-GFP und HisF-GFP über den gesamten Zellkörper verteilt in löslicher Form vorliegen. Die höhere Löslichkeit von HisF im Vergleich zu HisA (Abbildung 26B) ist anhand der stärkeren Fluoreszenz der Zelle in Abbildung 27C erkennbar.



**Abbildung 28: GFP-Fluoreszenz von *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS Zellen sowie der unlöslichen und löslichen Zellfraktion, nach heterologer Expression von HisAF-GFP, HisA-GFP und HisF-GFP.**

Die Analyse der GFP-Fluoreszenz erfolgte mit einer auf  $OD_{600} = 0,5$  normierten Zellmenge. Die Messungen wurden in einer 0,5 cm Küvette im Fluorimeter durchgeführt (PMV: 700; ex slit: 5 nm; em slit: 5 nm; Messzeit: 5 s/Probe; Programmmodul: Simple Reads). Gezeigt ist der Mittelwert von jeweils drei Messungen.

Die Daten aus Abbildung 28 bestätigen die aus der FACS-Analyse und den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der *E. coli* Zellen gezogenen Schlussfolgerungen. Zellen, die HisAF-GFP heterolog exprimieren, zeigen eine etwa doppelt so hohe Fluoreszenz der unlöslichen Zellfraktion im Vergleich zur löslichen Zellfraktion. Demgegenüber zeigen Zellen, die HisA- bzw. HisF-GFP heterolog exprimieren eine etwa vier bis sieben Mal höhere GFP-Fluoreszenz in der löslichen im Vergleich zur unlöslichen Zellfraktion. Der Grund für die höhere Fluoreszenz der löslichen Zellfraktionen von Zellen mit HisA- und HisF-GFP gegenüber der Gesamtfluoreszenz der Zellen ist unklar. Möglicherweise ist die eingesetzte Zellmenge von  $OD_{600} 0,5$  zu hoch für die fluorimetrische Messung, sodass nicht das gesamte emittierte Licht der Zellen detektiert werden kann.

Aufgrund der FACS-, fluoreszenzmikroskopischen und fluorimetrischen Analysen von *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS Zellen, die HisAF-, HisA- und HisF-GFP heterolog exprimieren, wurde davon ausgegangen, dass mit den genannten Analysemöglichkeiten ein erfolgreiches *Screening* nach verbesserten HisAF-Varianten in Hinblick auf Löslichkeit und Stabilität durchgeführt werden kann.

#### **4.3.2.1 Herstellung und Charakterisierung einer *hisAF*-Genbank und anschließendes *in vivo* Screening durch FACS-Analyse**

Für die Erstellung einer Genbank wurden in *hisAF* durch *epPCR* Punktmutationen eingefügt. Als Templat für die Amplifikation wurde pER13a-*hisAF* mit den genflankierenden Primern 5'pET-*NdeI* und 3'pER13a-*NotI* eingesetzt, wobei 0,5 mM MnCl<sub>2</sub> und ein unausgeglichenes Verhältnis von dNTPs verwendet wurde (3.3.7.4). Das Gemisch der *hisAF*-Mutanten wurde unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *NotI* in pER13a ligiert und zur Transformation von XL1 Blue MRF' Zellen verwendet. Die erzeugte *hisAF*-Genbank umfasste ca.  $1,1 \cdot 10^6$  unabhängige Varianten (3.3.8.1). Durchschnittlich konnte ein Nukleotidaustausch pro *hisAF* Gensequenz beobachtet werden, wobei 0–3 Nukleotidaustausche pro Gen auftraten. Der Wert für das Verhältnis von Ts/Tv betrug 2,2, was auf eine ausgeglichene Mutationsverteilung hinweist. Obwohl die Mutationsfrequenz mit durchschnittlich einem Nukleotidaustausch pro Gen gering ausfiel, wurde mit dieser Genbank ein *in vivo* Screening durchgeführt, da bei vergleichbaren Arbeiten zur Verbesserung der Stabilität und Löslichkeit von HisF-C\**C* ein bis zwei Austausche ausgereicht haben, um einen deutlichen Effekt zu erzielen (Seitz *et al.*, 2007).

Durch die zufällige Mutagenese von *hisAF* sollten Mutationen eingefügt werden, die die Löslichkeitseigenschaften von HisAF positiv beeinflussen. Es wurde erwartet, dass diese Varianten bei einer FACS-Analyse höhere Fluoreszenzintensitäten aufweisen (vgl. Abbildung 26). Um für die jeweilige Sortierung den *Screening*-Bereich zu ermitteln, wurde jeweils vor der präparativen Sortierung eine FACS-Analyse mit  $3 \cdot 10^5$  Zellen durchgeführt. Die in den folgenden Abbildungen gezeigten Diagramme zeigen in der Regel diesen vorgeschalteten analytischen Schritt, dessen Ergebnis stets dem der präparativen Sortierung entsprach.

Bei dem im Folgenden dargestellten *in vivo* Screening im FACS mit der erstellten pER13-*hisAF* Genbank und *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS Zellen wurden insgesamt fünf Anreicherungsrounds durchgeführt. Nach jeder Runde wurden die heraussortierten

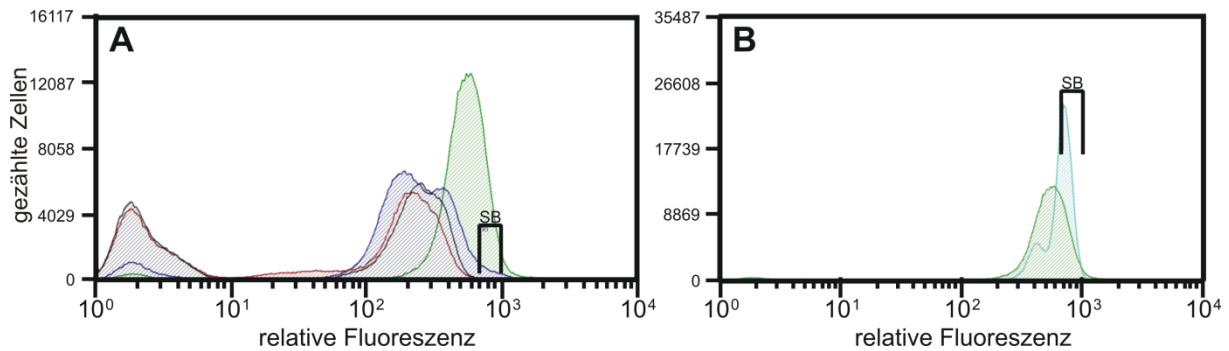
Zellen mit LB-Medium versetzt und über Nacht bei 37 °C in 5 ml LB<sub>Kan</sub>-Medium angezogen. Daraus wurden für die folgende Anreicherungsrunde Zellen entnommen, um eine frische 5 ml LB<sub>Kan</sub>-Kultur auf OD<sub>600</sub> = 0,1 anzuimpfen. Diese wurde bei  $0,6 \leq OD_{600} \leq 0,8$  mit 0,5 mM IPTG induziert und für 4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 ml der Zellkultur abgenommen, mit 1x PBS gewaschen, im gleichen Volumen dieses Puffers resuspendiert und zur Sortierung verwendet. Am FACS-Gerät wurde ein *Screening*-Bereich zwischen  $7 \cdot 10^2$  und  $1 \cdot 10^3$  relativen Fluoreszenzeinheiten festgelegt. Ab der dritten Anreicherungsrunde konnten bei der Sortierung mehr als  $1 \cdot 10^6$  Zellen im definierten *Screening*-Bereich aufgefangen werden. Mit diesen wurde ein sog. „Resort“ durchgeführt, das heißt, diese Zellen wurden nach Herausortierung ohne erneutes Anwachsen einer zweiten Sortierung unterzogen. Eine Übersicht über die einzelnen Anreicherungsrounden gibt Tabelle 7.

**Tabelle 7: Übersicht über die FACS-basierte Anreicherung von *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS Zellen mit der *hisAF*-Genbank.**

Anreicherungs- runde	Analysierte Zellen (gesamt)	Zellzahl im <i>Screening</i> - Bereich (prozentualer Anteil)	Gesamtzellzahl beim „Resort“	Zellzahl im <i>Screening</i> - Bereich beim „Resort“ (prozentualer Anteil)
1.	$1,37 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^5$ (0,13 %)	-	-
2.	$1,29 \cdot 10^8$	$2,6 \cdot 10^5$ (0,19 %)	-	-
3.	$9,9 \cdot 10^7$	$1,15 \cdot 10^6$ (1,15 %)	$1,16 \cdot 10^6$	$4,95 \cdot 10^5$ (42,6 %)
4.	$4,3 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^6$ (3,5 %)	$1,48 \cdot 10^6$	$5,58 \cdot 10^5$ (37,4 %) <sup>a</sup>
5.	$3,8 \cdot 10^7$	$3,7 \cdot 10^6$ (9,64 %)	$1,8 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^6$ (55,5 %) <sup>a</sup>

<sup>a</sup>: Von diesen beiden „Resorts“ wurden einzelne Zellen auf LB<sub>Kan</sub>-Agarplatten vereinzelt: Vom Resort der 4. Anreicherungsrunde waren dies 156 Zellen, vom Resort der 5. Anreicherungsrunde 208 Zellen.

In Abbildung 29A sind die zugehörigen analytischen FACS-Histogramme der Anreicherungsrounden eins, drei und fünf dargestellt. Abbildung 29B zeigt die fünfte Anreicherungsrunde mit dem anschließenden „Resort“, aus dem *E. coli* Zellen auf LB<sub>Kan</sub>-Agarplatten vereinzelt wurden.

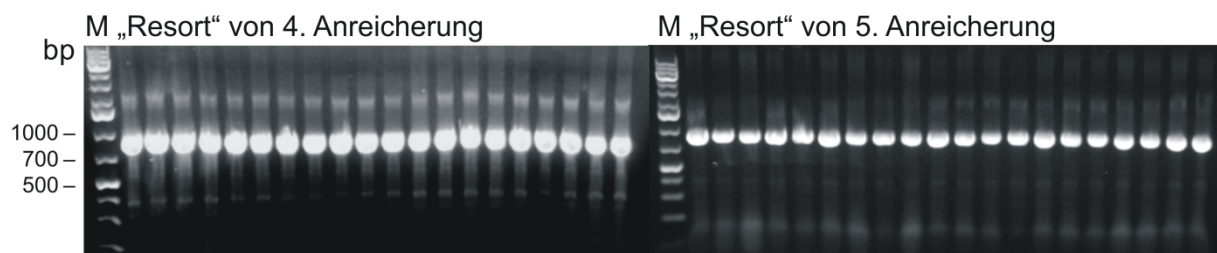


**Abbildung 29: Analytische FACS-Histogramme der Anreicherungsrounden 1, 3 und 5 der *hisAF*-Genbank (A) und Anreicherungsrounde 5 mit anschließendem „Resort“ (B).**

Schwarz: *HisAF*-GFP; rot: *hisAF*-Genbank-GFP/1. Runde; blau: 3. Runde; grün: 5. Runde; cyan: „Resort“ nach 5. Anreicherungsrounde; SB: *Screening*-Bereich. Für jedes Histogramm wurden  $3 \cdot 10^5$  Zellen gezählt. Dass das Maximum der *E. coli* Zellen mit *HisAF*-GFP im Vergleich zu Abbildung 26 zu einer höheren Fluoreszenzintensität verschoben ist, ist durch unterschiedliche Kalibrierungen des FACS-Geräts begründet.

Die Ergebnisse aus Tabelle 7 und Abbildung 29 entsprechen den Erwartungen für ein *in vivo Screening* einer Genbank. Es wurde beobachtet, dass der prozentuale Anteil der Zellen, die ein Fluoreszenzsignal im *Screening*-Bereich produzieren, mit jeder Anreicherungsrounde stetig zunahm, sodass ab der dritten Anreicherungsrounde jeweils ein „Resort“ möglich war. Insgesamt hat sich der prozentuale Anteil der im *Screening*-Bereich detektierten Zellen von 0,13 % für die erste Sortierungsrounde auf 55,5 % für den Resort der fünften Sortierungsrounde erhöht.

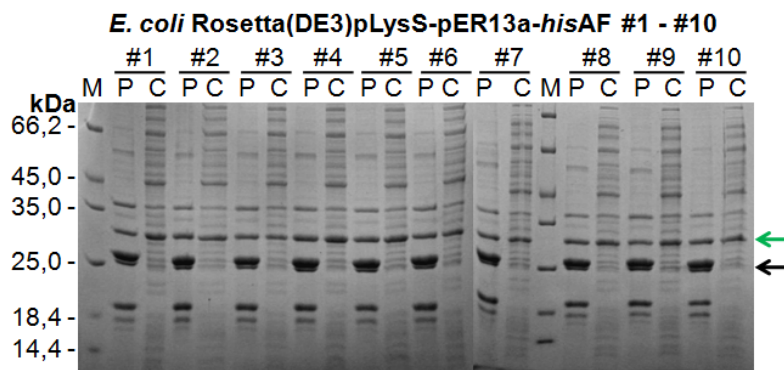
Mit den auf LB<sub>Kan</sub>-Agarplatten vereinzelter Zellen wurde nach Inkubation bei 37 °C üN eine Kolonie-PCR durchgeführt (3.3.6), um auf DNA-Ebene das Vorliegen des vollständigen *hisAF*-Gens zu überprüfen. Es wurden jeweils 20 Kolonien des „Resorts“ der vierten und fünften Anreicherungsrounde mittels Kolonie-PCR untersucht. Dazu wurden zwei Primer verwendet (5'T7 Promotor und 3'GFPdown), die sich jeweils ca. 70 bp ober- bzw. unterhalb des *hisAF*-Gens anlagern (Abbildung 30).



**Abbildung 30: Analyse der Sortierung der *hisAF*-Genbank mittels Kolonie-PCR am Beispiel von jeweils 20 zufällig ausgewählten Kolonien aus dem „Resort“ der vierten und fünften Anreicherungsrounde (1%iges Agarosegel).**

Die erwartete Größe des Amplifikationsprodukts liegt bei ca. 900 bp (Amplifikation mit 5'T7P und 3'GFPdown), welches alle analysierten Klone zeigen. M: DNA-Längenstandard GeneRuler 1 kb Plus

Aufgrund des Ergebnisses der Kolonie-PCR (Abbildung 30) konnte davon ausgegangen werden, dass die isolierten Zellen das vollständige HisAF-GFP-Fusionsprotein exprimierten. Um dies zu überprüfen, wurden Expressionen im analytischen Maßstab mit zehn Klonen der Kolonie-PCR durchgeführt (Abbildung 31).



**Abbildung 31: SDS-PAGE Analyse von zehn zufällig ausgewählten Klonen der in Abbildung 30 dokumentierten Kolonie-PCR.**

Das SDS-Gel (12,5 % Polyacrylamid) zeigt die unlöslichen (P) und die löslichen (C) Zellfraktionen der Klone #1 bis #10 aus einer Expression im analytischen Maßstab. M: Markerproteine mit molekularer Masse in kDa. Die Proteinexpression wurde durch 0,5 mM IPTG induziert.

Entgegen der Erwartung eines Fusionsproteins bestehend aus HisAF und GFP bei ca. 55 kDa, erkennt man in Abbildung 31 dominante Banden in der unlöslichen Fraktion bei ca. 25 kDa (schwarzer Pfeil) und in der löslichen Fraktion bei ca. 30 kDa (grüner Pfeil). Daraufhin wurde von vier der 40 mittels Kolonie-PCR untersuchten Klone das pER13a-Plasmid durch eine DNA-Präparation aus den *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS Zellen isoliert und das enthaltende *hisAF*-Gen vollständig sequenziert. Drei der vier Sequenzen zeigten eine Deletion der Base G613 (Glu205), eine Sequenz zeigte die Deletion der Base C582 (Pro194). Der in beiden Fällen resultierende *Frameshift* führt zu einem TGA-Stoppcodon an Position 691. Bemerkenswerterweise findet man in drei der vier Sequenzen zusätzlich die Mutation G690A, wodurch ein ATG-Startcodon entsteht. Das heißt, dass die Basenabfolge TG an dieser Stelle – abhängig vom *Frame* – sowohl Teil eines Start- als auch eines Stoppcodon ist (Abbildung 32).

```

hisAF          5'-ATC GAC GTG AGA GAA-3'
hisAF_del      5'-A TCG ACA TGA GAG AA-3'

```

**Abbildung 32: Sequenzausschnitt des *hisAF*-Gens von Base 685 bis 699.**

Lücken stellen den Leserahmen dar. *hisAF\_del*: Durch Basendeletion an Position C582 bzw. G613 verursachter *Frameshift*, welcher zu einem TGA-Stoppcodon (unterstrichen) führt; fett: Codon für V231; grün: Mutation G691A, die zu einem ATG-Startcodon führt.



Sollte bei den im FACS-Screening gefundenen Varianten die Translation des *hisAF*-Gens am durch die Basendeletion entstandenen Codon V231 abbrechen, gleichzeitig aber die Translation am entstandenen ATG-Startcodon neu beginnen, würden an HisAF C-terminal 20 Aminosäuren (2,4 kDa) fehlen, die an GFP N-terminal zusätzlich vorhanden wären. In Abbildung 31 wird genau das beobachtet. Die Bande in der löslichen Zellfraktion (grüner Pfeil) entspricht dem 28 kDa großen GFP mit den zusätzlichen 20 Aminosäuren von HisAF, während die Bande bei 25 kDa (schwarzer Pfeil) HisAF ohne die 20 Aminosäuren darstellt. Abschließend wurde überprüft, ob die lösliche Zellfraktion der zehn in der Probeexpression verwendeten Klone eine stärkere Fluoreszenzintensität zeigt, als die lösliche Fraktion von Zellen, die HisAF-GFP heterolog exprimieren (Abbildung 28). Dazu wurde der lösliche Überstand der zehn Klone im Fluorimeter vermessen. Dabei zeigten alle Klone eine GFP-Fluoreszenz zwischen 800 und 1000 relativen Fluoreszenzeinheiten (Daten nicht gezeigt) und lagen somit wesentlich über der von HisAF-GFP (Abbildung 28 und Abbildung 35).

Somit kann zusammenfassend festgehalten werden, dass das FACS-Screening zur Isolierung stärker fluoreszierender Zellen geführt hat. Bei der Analyse der gefundenen *hisAF*-Mutanten wurde jedoch festgestellt, dass es sich dabei um falsch-positive Klone handelt, da diese Zellen statt des erwarteten HisAF-GFP-Fusionsproteins isoliertes GFP heterolog exprimierten. Die Ursache für die beobachteten Basendeletionen in *hisAF* und dem daraus resultierenden Translationsstopp bzw. Neustart ist unklar.

Da in früheren Arbeiten positive Ergebnisse erzielt werden konnten, wenn nur eine Genhälfte randomisiert vorlag (Seitz *et al.*, 2007), sollte ein entsprechender Ansatz für HisAF durchgeführt werden. Dazu wurde der HisA-Teil von HisAF randomisiert und aus Klonierungsgründen (siehe nächstes Kapitel) über einen GlySerGly-Linker mit dem unveränderten HisF-Teil von HisAF verbunden werden. Höcker (2002) konnte zeigen, dass der GlySerGly-Linker keinen Einfluss auf die biophysikalischen Eigenschaften von HisAF hat.

#### 4.3.2.2 Herstellung und Charakterisierung einer *hisA<sub>rand</sub>*F-Genbank und anschließendes *in vivo* Screening durch FACS-Analyse

Bevor eine *hisA<sub>rand</sub>*F-Genbank erstellt wurde, wurde das Fluoreszenzsignal des Fusionsproteins HisF-C-GFP (C-terminaler Teil von HisAF, fusioniert an GFP) überprüft. Dazu wurde *hisF-C* durch PCR mit den Primern 5'*hisF-C-NdeI/BamHI* und 3'*hisF-GFP (NotI)* sowie dem Templat pET24a-*hisF-C* (Höcker, 2002) in pER13a über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *NotI* kloniert. Eine FACS-Analyse von *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS Zellen, die HisF-C-GFP heterolog exprimieren, lieferte ein identisches Histogramm wie Zellen, die HisAF-GFP heterolog exprimieren (Daten nicht gezeigt). Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die Löslichkeit und die Faltungseigenschaften von GFP durch HisF-C und HisAF in gleicher Weise beeinflusst werden.

Durch den GlySerGly-Linker zwischen der N-terminalen Hälfte von HisA und der C-terminalen Hälfte von HisF wird eine *BamHI*-Schnittstelle eingefügt. Deshalb musste aus dem pER13a-Vektor eine *BamHI*-Schnittstelle durch zwei stille Mutationen mittels QuickChange-PCR (3.3.7.3) entfernt werden. In diesen pER13a\_*BamHI*-Vektor wurde *hisF-C* mit den Primern 5'*hisF-C\_NdeI/BamHI* (*upstream* von *hisF-C* liegt zunächst eine *NdeI*- und dann eine *BamHI*-Schnittstelle) und 3'*hisF-NotI-GFP* kloniert, was den Vektor pER13a\_*BamHI-hisF-C* lieferte. In diesen Vektor wurde über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *BamHI* die randomisierte N-terminale Hälfte von HisA (*hisA-N*) kloniert.

Als Templat für die *epPCR* wurde pET24a mit kloniertem *hisA<sub>N</sub>* verwendet. Die Amplifikation erfolgte mit den genflankierenden Primern 5'*pET-NdeI* und 3'*pET-BamHI* unter Verwendung von 0,7 mM MnCl<sub>2</sub> und mit einem unausgeglichenes Verhältnis von dNTPs (3.3.7.4). Das Gemisch der *hisA<sub>N</sub>*-Mutanten wurde unter Verwendung der Restriktionsenzyme *NdeI* und *BamHI* in pER13a\_*BamHI-hisF-C* ligiert und zur Transformation von XL1 Blue MRF' Zellen verwendet. Die erzeugte *hisA<sub>rand</sub>*F-Genbank enthielt ca.  $1,3 \cdot 10^5$  unabhängige Varianten. Bei dieser Abschätzung ist berücksichtigt, dass die Ligationseffizienz (bestimmt über Kolonie-PCR von 20 zufällig ausgewählten Klonen) nur 25 % betrug. Durchschnittlich konnten 2,4 Nukleotidaustausche pro *hisA<sub>rand</sub>*F-Gensequenz beobachtet werden, wobei 1–4 Nukleotidaustausche pro Gen (*hisA<sub>N</sub>*) auftraten. Der Wert für das Verhältnis von Ts/Tv betrug 1,0, was auf eine perfekt ausgeglichene Mutationsverteilung hindeutet.

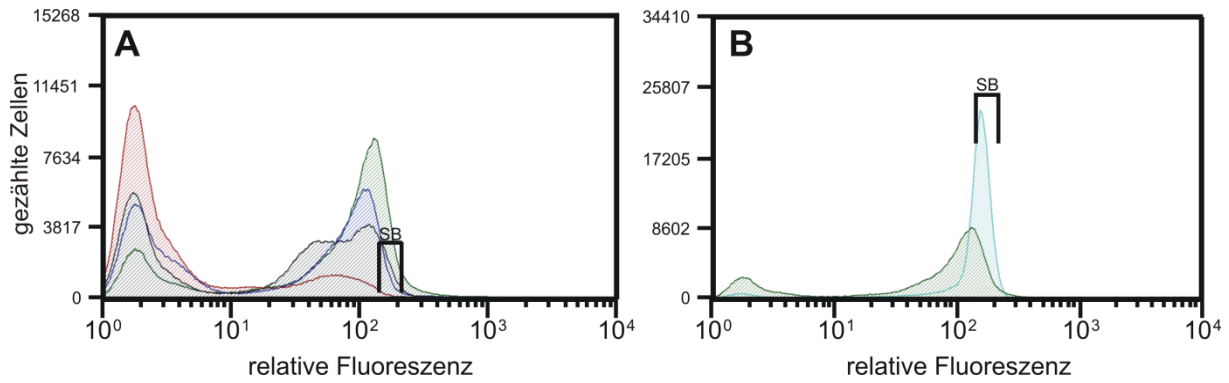
Das Vorgehen des im Folgenden dargestellten *in vivo Screenings* mit *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS Zellen im FACS entspricht dem aus Kapitel 4.3.2.1. Es wurden insgesamt vier Anreicherungsrounds durchgeführt. Aufgrund der Beobachtung, dass beim *in vivo Screening* der *hisAF*-Genbank beim gewählten Intensitätsbereich von  $7 \cdot 10^2$  bis  $1 \cdot 10^3$  relativen Fluoreszenzeinheiten nur falsch-positive Zellen herausortiert wurden (4.3.2.1), wurde der *Screening*-Bereich für die *hisA<sub>rand</sub>F*-Genbank auf den Bereich um  $7 \cdot 10^2$  vermindert. Aufgrund der hohen Zahl der Religanden (75 %) in der Genbank, wurde die Plasmid-DNA eines Religanden aus *E. coli* XL1 Blue MRF' isoliert und anschließend *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS Zellen mit dieser transformiert. Das FACS-Histogramm dieser mit einem religierten pER13a-*Bam*HI-*hisF*-C Plasmid transformierten Zellen zeigte extrem niedrige Fluoreszenz (Fluoreszenzintensität zwischen  $10^0$  und  $10^1$ ; Daten nicht gezeigt). Daraus wurde geschlossen, dass die hohe Zahl der Religanden keinen Einfluss auf die Sortierung der Genbank im FACS haben sollte. Eine Übersicht über die einzelnen Anreicherungsrounds gibt Tabelle 8.

**Tabelle 8: Übersicht über die FACS-basierte Anreicherung von *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS Zellen mit der *hisA<sub>rand</sub>F*-Genbank.**

Anreicherungs- runde	Analysierte Zellen (gesamt)	Zellzahl im <i>Screening</i> - Bereich (prozentualer Anteil)	Gesamtzellzahl beim „Resort“	Zellzahl im <i>Screening</i> - Bereich beim „Resort“ (prozentualer Anteil)
1.	$1,1 \cdot 10^8$	$8,6 \cdot 10^5$ (0,75 %)	$9,3 \cdot 10^5$	$4,3 \cdot 10^5$ (45,3 %)
2.	$2,47 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^6$ (8,1 %)	$1,84 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^6$ (54,6 %)
3.	$2,2 \cdot 10^7$	$4,0 \cdot 10^6$ (18,5 %)	1.: $2,4 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^6$ (61,5 %)
			2.: $1,0 \cdot 10^6$	$8,1 \cdot 10^5$ (79,5 %)
4.	$2,26 \cdot 10^7$	$4,05 \cdot 10^6$ (17,9 %)	$3,0 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^6$ (67,6 %) <sup>a</sup>

<sup>a</sup>: Von diesem „Resort“ wurden 156 Zellen auf LB<sub>Kan</sub>-Agarplatten vereinzelt. Bei Anreicherungsrounde 3 wurden zwei „Resorts“ hintereinander durchgeführt.

In Abbildung 33A sind die zugehörigen analytischen FACS-Histogramme der Anreicherungsrounds eins, zwei und vier gezeigt. Abbildung 33B zeigt die vierte Anreicherungsrounde mit dem anschließenden „Resort“, aus dem 156 Zellen auf LB<sub>Kan</sub>-Agarplatten vereinzelt wurden.

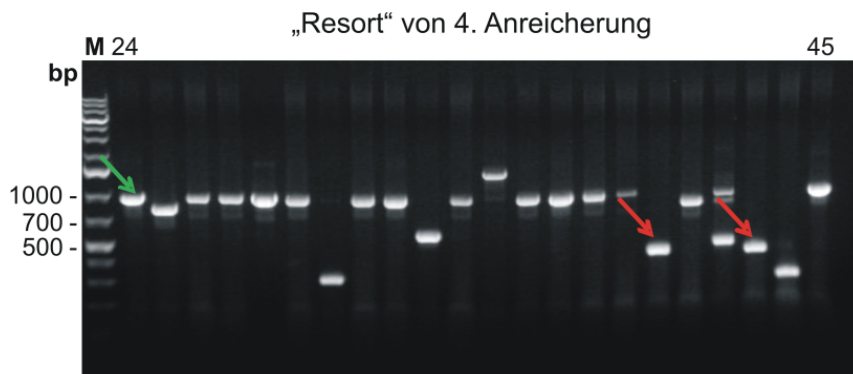


**Abbildung 33: Analytische FACS-Histogramme der Anreicherungsrounds 1, 2 und 4 der *hisA<sub>rand</sub>F*-Genbank (A) und Anreicherungsrounde 4 mit anschließendem „Resort“ (B).**

Schwarz: *HisAF*-GFP; rot: *hisA<sub>rand</sub>F*-Genbank-GFP/1. Runde; blau: 2. Runde; grün: 4. Runde; cyan: „Resort“ nach 4. Anreicherungsrounde; SB: *Screening*-Bereich. Für jedes Histogramm wurden  $3 \cdot 10^5$  Zellen gezählt. Die große Anzahl nicht-fluoreszierender Zellen in der *hisA<sub>rand</sub>F*-Genbank-GFP wird durch die hohe Zahl von Religanden hervorgerufen (siehe Erläuterung im Text). Der Unterschied zur Sortierung der *hisAF*-Genbank liegt in der Wahl des *Screening*-Bereichs. Bei dieser Sortierung wurde ein *Screening*-Bereich deutlich näher am Hauptpeak der *hisA<sub>rand</sub>F*-Genbank gewählt. Zusätzlich wurden auch *Screening*-Bereiche bei höheren Fluoreszenzintensitäten (von  $2 \cdot 10^2$  bis  $1 \cdot 10^3$ ) gewählt. Aus diesen *Screening*-Bereichen wurden jedoch nur falsch-positive Klone gewonnen (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse aus Tabelle 8 und Abbildung 33 entsprechen den Erwartungen für ein *in vivo Screening* einer Genbank. Es kann beobachtet werden, dass der prozentuale Anteil der Zellen, die ein Fluoreszenzsignal im *Screening*-Bereich erzeugen, mit jeder Anreicherungsrounde stetig zunimmt. Da der *Screening*-Bereich deutlich näher am Hauptpeak gewählt wurde als bei der *hisAF*-Genbank, konnten bereits ab der ersten Anreicherungsrounde „Resorts“ durchgeführt werden. In den vier Anreicherungsrounden erhöhte sich der prozentuale Anteil von Zellen im *Screening*-Bereich von 0,75 % für die erste Sortierungsrounde auf 67,6 % für den Resort der vierten Sortierungsrounde.

Von den 156 auf  $LB_{Kan}$ -Agarplatten vereinzelter Zellen sind nach Inkubation bei  $37^\circ C$  über Nacht 147 Kolonien gewachsen. Mit allen wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt (3.3.6), um auf DNA-Ebene das Vorliegen des vollständigen *hisA<sub>rand</sub>F*-Gens zu überprüfen. Dazu wurden zwei Primer verwendet (5'T7 Promotor und 3'GFPdown), die sich jeweils ca. 70 bp ober- bzw. unterhalb des *hisAF*-Gens anlagern. Das Ergebnis ist in Abbildung 34 gezeigt.

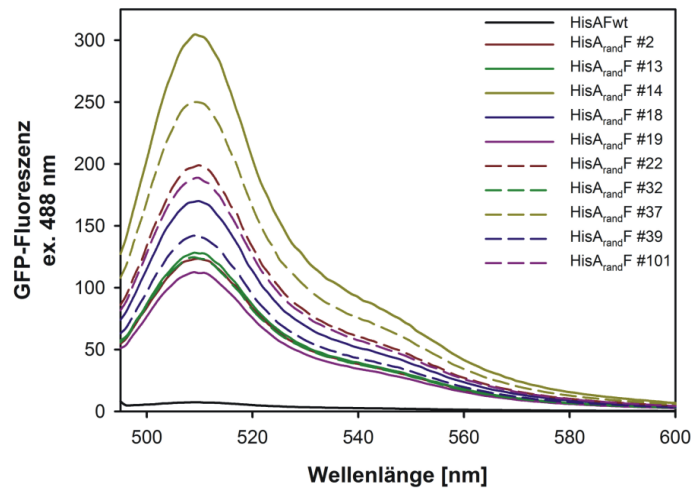


**Abbildung 34: Analyse der Sortierung der *hisA<sub>rand</sub>F*-Genbank mittels Kolonie-PCR am Beispiel der Kolonien #24 bis #45 aus dem „Resort“ der vierten Anreicherung (1%iges Agarosegel).**

Die erwartete Größe des Amplifikationsprodukts liegt bei ca. 900 bp (grüner Pfeil; Amplifikation mit 5'T7P und 3'GFPdown), welches 14 der analysierten Klone zeigen; neun Klone zeigen eine abweichende Größe des Amplifikationsprodukts. Davon zeigen aber nur zwei (rote Pfeile) die erwartete Größe von ca. 500 bp für eine Religation, in der *hisF*-C im pER13a-*Bam*HI-Vektor erhalten geblieben ist. Die kürzeren Amplifikationsprodukte deuten darauf hin, dass es zu unspezifischen Schnitten während des Restriktionsverdaus mit *Nde*I und *Bam*HI im *hisF*-C-Gen gekommen ist. M: DNA-Längenstandard GeneRuler 1 kb Plus

Von den 147 mittels Kolonie-PCR analysierten Klonen enthielten 102 Klone ein Amplifikationsprodukt mit der erwarteten Länge von ca. 900 bp, während 45 Klone eine davon abweichende Länge zeigten. Da in Kapitel 4.3.2.1 gezeigt werden konnte, dass über die Analyse der Genlänge keine Aussage über mögliche Basendeletionen getroffen werden können, wurden mit 40 der 102 Klone Expressionen im analytischen Maßstab durchgeführt. Von den 40 analysierten Klonen zeigten 32 die heterologe Expression des Fusionsproteins HisA<sub>rand</sub>F-GFP bei ca. 55 kDa (Daten nicht gezeigt). Von diesen 32 Klonen konnte mittels SDS-PAGE lediglich bei einer Variante eine schwache Expression in der löslichen Zellfraktion beobachtet werden (HisA<sub>rand</sub>F #14), während bei den restlichen 31 Klonen das Fusionsprotein HisA<sub>rand</sub>F-GFP nur in der unlöslichen Zellfraktion nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Zur weiteren Quantifizierung der Expression des Fusionsproteins in der löslichen Zellfraktion wurde diese von den 32 Klonen im Spektralfluorimeter vermessen.

Von diesen 32 Klonen sind die zehn mit der höchsten Fluoreszenzintensität im Vergleich zu HisAFwt in Abbildung 35 dargestellt.



**Abbildung 35: GFP-Fluoreszenz der löslichen Zellfraktion von aus der pER13a-*hisA<sub>rand</sub>F*-Genbank isolierten *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS Zellen.**

Gezeigt ist das HisA<sub>rand</sub>F-GFP-Fluoreszenzspektrum der zehn Klone mit der höchsten Fluoreszenzintensität. Die Nummerierung bezieht sich auf die Nummer des Klon in der Kolonie-PCR. Die Analyse der GFP-Fluoreszenz erfolgte mit einer nicht-normierten Zellmenge. Die Messungen wurden in einer 1 cm Küvette im Fluorimeter (PMV: 700; ex slit: 5 nm; em slit: 5 nm) durchgeführt.

Abbildung 35 zeigt, dass die zehn untersuchten HisA<sub>rand</sub>F-Varianten eine stärkere GFP-Fluoreszenz der löslichen Zellfraktion aufweisen, als dies bei HisAFwt der Fall ist. Insbesondere für die HisA<sub>rand</sub>F-Varianten #14 und #37 kann eine GFP-Fluoreszenz von 300 bzw. 250 Fluoreszenzeinheiten bei 510 nm beobachtet werden, was deutlich über den 7 Fluoreszenzeinheiten von HisAF-GFP liegt. Die in diesen zehn HisA<sub>rand</sub>F-Varianten mittels DNA-Sequenzierung identifizierten Aminosäureaustausche und stille Mutationen sind in Tabelle 9 aufgelistet.

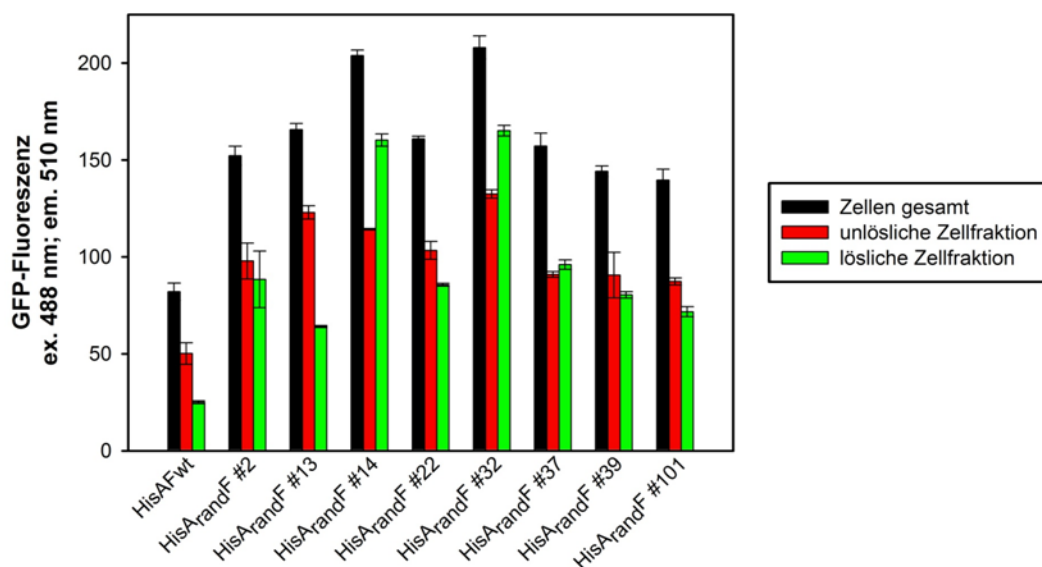
**Tabelle 9: Ergebnis des *in vivo* Screenings der *hisA<sub>rand</sub>F*-Genbank am FACS.**

Bei den stillen Mutationen ist jeweils die codierte Aminosäure angegeben.

HisA <sub>rand</sub> F Variante	Austausche	Stille Mutationen
#2	K13R, T25S, K113E	K22
#13	V36M, G81E, L112M	G12, V105, D119
#14	A6E	-
#18	V4A, R98K	P5
#19	-	A6, V101, D119
#22	A6T, E37K	-
#32	L2P, D8V, E41D, S59N	-
#37	D8V	G12
#39	A15T	D119
#101	F72Y	D119

Die in Tabelle 9 dokumentierten Daten zeigen, dass es nicht zu einer Anreicherung einer bestimmten Variante gekommen ist. Dennoch konnten zwei Positionen gefunden werden, die in jeweils zwei unabhängigen Varianten ausgetauscht sind – Ala6 und Asp8. Zusätzlich wurde eine Variante isoliert (#19), die nur drei stille Mutationen enthält. Das Auftreten dieser Variante kann nicht erklärt werden.

Da die Daten aus Abbildung 35 unter nicht-normierten Bedingungen gewonnen wurden, wurde die GFP-Fluoreszenz der HisA<sub>rand</sub>F-GFP-Varianten unter normierten Bedingungen in gleicher Weise, wie in Abbildung 28 dargestellt, durchgeführt (Abbildung 36).

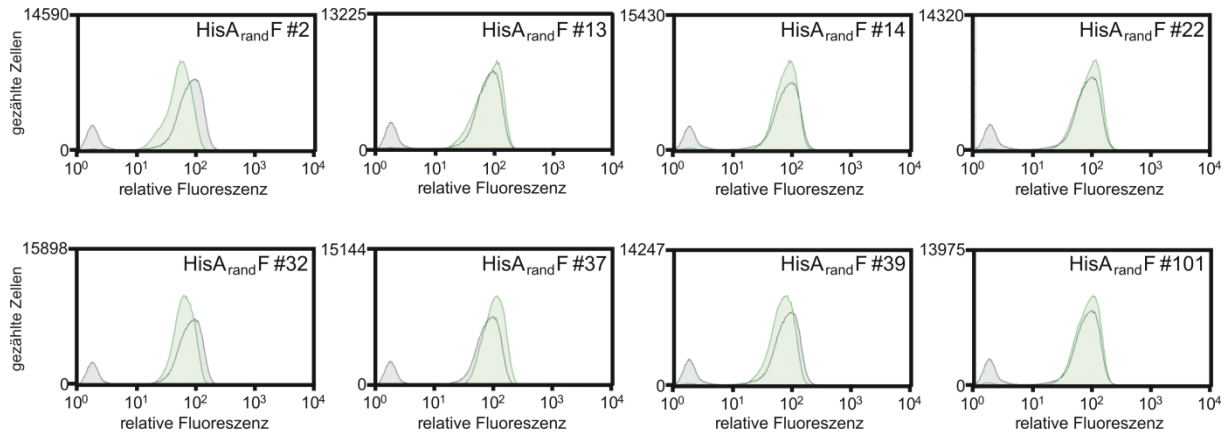


**Abbildung 36: GFP-Fluoreszenz von *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS Zellen, sowie der unlöslichen und löslichen Zellfraktion der im *in vivo* Screening isolierten HisA<sub>rand</sub>F-GFP-Varianten im Vergleich zu HisAFwt-GFP.**

Die Analyse der GFP-Fluoreszenz erfolgte mit einer auf OD<sub>600</sub> = 0,5 normierten Zellmenge. HisA<sub>rand</sub>F-GFP-Variante #18 wurde nicht berücksichtigt, da die in dieser Variante vorhandenen Austausche keine Verbesserung der Löslichkeitseigenschaften von HisAF bewirkten (vgl. Abbildung 38). HisA<sub>rand</sub>F-GFP-Variante #19 wurde ebenfalls nicht berücksichtigt, da hier nur stille Mutationen gefunden wurden (Tabelle 9). Die Messungen erfolgten in einer 0,5 cm Küvette im Fluorimeter (PMV: 700; ex slit: 5 nm; em slit: 5 nm; Messzeit: 5 s/Probe; Programmmodul: Simple Reads). Gezeigt ist der Mittelwert von jeweils drei Messungen.

Vergleicht man die normierten Daten der löslichen Zellfraktion (Abbildung 36) mit den nicht-normierten Daten aus Abbildung 35 fallen leichte Relativverschiebungen der Fluoreszenzintensitäten auf. Am deutlichsten wird dies bei der Betrachtung der Varianten #32 und #37. Bei den GFP-Spektren unter nicht-normierten Bedingungen liegt die Fluoreszenz von Variante #32 deutlich unter der von Variante #37, während nach der Normierung das Umgekehrte beobachtet wird. Nun liegt die Fluoreszenz des löslichen Zellextraktes von Variante #32 deutlich über der von Variante #37.

Zusätzlich wurden mit den in Abbildung 36 charakterisierten HisA<sub>rand</sub>F-Varianten analytische FACS-Läufe durchgeführt, um ihr Fluoreszenzsignal mit dem von HisAFwt zu vergleichen (Abbildung 37).



**Abbildung 37: Analytische FACS-Histogramme der im *in vivo* Screening isolierten HisA<sub>rand</sub>F-Varianten (grün) im Vergleich zu HisAFwt (schwarz).**  
Für jedes Histogramm wurden  $3 \cdot 10^5$  Zellen gezählt.

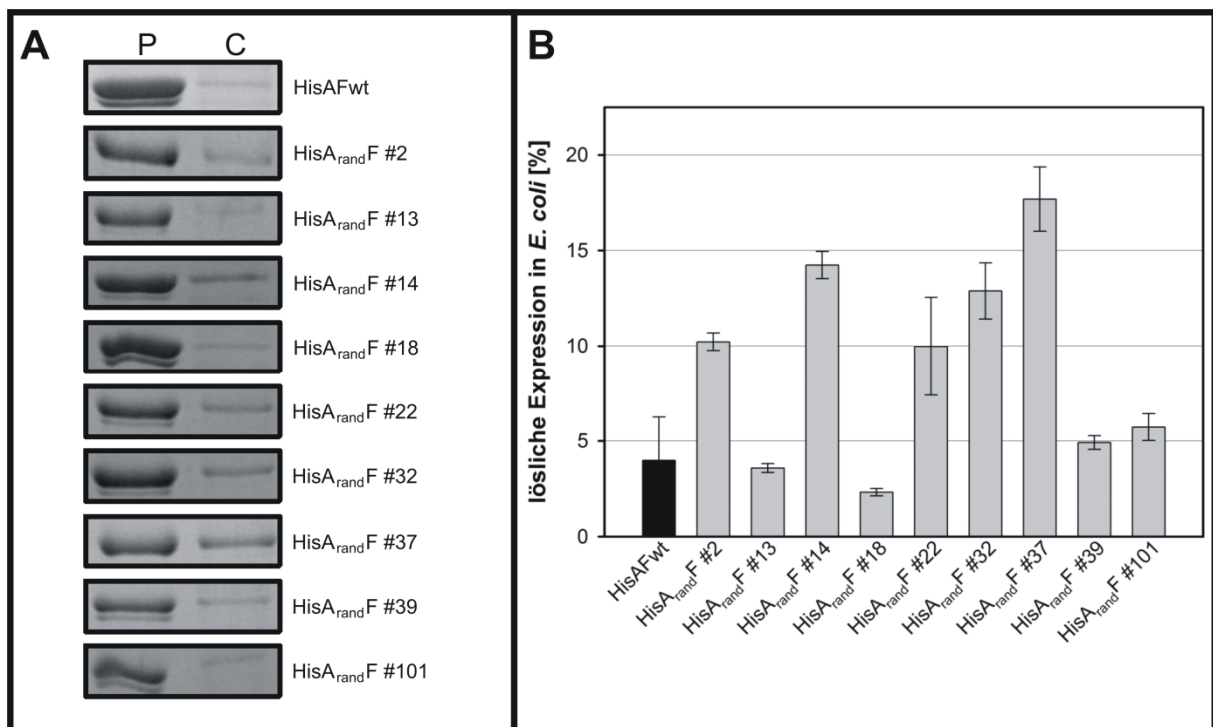
Vergleicht man die in Abbildung 37 gezeigten Ergebnisse mit den Fluoreszenzspektrometerdaten (Abbildung 35 und Abbildung 36) fällt auf, dass sich die Ergebnisse nicht gegenseitig stützen. Die analytischen FACS-Histogramme (Abbildung 37) deuten darauf hin, dass es nur bei HisA<sub>rand</sub>F-Variante #37 zu einer leicht erhöhten Fluoreszenzintensität der Zellen kommt. Alle anderen Varianten liefern ein Fluoreszenzsignal, das dem vom HisAFwt entspricht oder sogar leicht verschlechtert (HisA<sub>rand</sub>F #2 und #32) ist.

Bisher lieferten die Charakterisierungen der an GFP fusionierten HisA<sub>rand</sub>F-Varianten keinen eindeutigen Hinweis darauf, welche der Varianten eine Verbesserung in Hinblick auf Löslichkeit und Stabilität liefert. Um mögliche Artefakte durch die Fusion an GFP auszuschließen und zur weiteren Charakterisierung der HisA<sub>rand</sub>F-Varianten wurden alle außer #19 (enthielt nur stille Mutationen) mittels PCR über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *NotI* in pET21a umklontiert und somit bei der Expression mit einem C-terminalen (His)<sub>6</sub>-Tag für die Reinigung mittels Nickel-Chelat-Affinitätschromatografie versehen. Die erwartete Nukleotidabfolge wurde durch die vollständige DNA-Sequenzierung der neun HisA<sub>rand</sub>F-Varianten bestätigt.



#### 4.3.2.2.1 Charakterisierung der HisA<sub>rand</sub>F-Varianten auf Löslichkeit und Stabilität

Zur Bestimmung der Löslichkeit der HisA<sub>rand</sub>F-Varianten ohne GFP-Fusion wurden Expressionen im analytischen Maßstab in *E. coli* T7 Express Rosetta Zellen durchgeführt. Anschließend erfolgte eine SDS-Gel Analyse der löslichen und unlöslichen Zellfraktion mittels OptiQuant (3.5.2.2). In Abbildung 38 sind die Ergebnisse dargestellt.



**Abbildung 38: Löslichkeitsanalyse der isolierten HisA<sub>rand</sub>F-Varianten im Vergleich zu HisAFwt.**

**A:** Unlösliche (P) und lösliche (C) Fraktionen von *E. coli* T7 Express Rosetta Zellen mit den rekombinanten Proteinen (SDS-Gel; 12,5 % Polyacrylamid; gefärbt mit Commassie-blau).

**B:** Prozentanteil der löslich hergestellten Proteine, jeweils als Mittelwert aus der Analyse von drei verschiedenen Klonen. Proteinbanden aus einer SDS-Gel Analyse der Proteine wurden fotografiert und ihre Intensitäten mittels OptiQuant bestimmt (3.5.2.2).

Die Daten zeigen, dass durch die Austausche in den HisA<sub>rand</sub>F-Varianten #2, #14, #22, #32 und #37 die Löslichkeit deutlich gesteigert werden konnte (Tabelle 10).

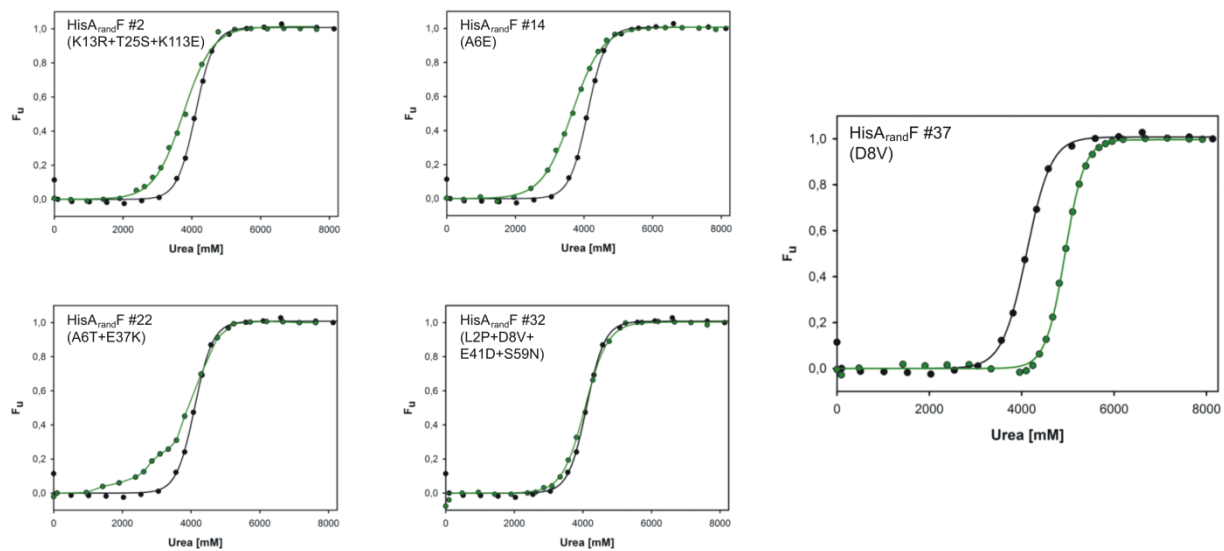
Tabelle 10: Ergebnis der Löslichkeitsanalyse der HisA<sub>rand</sub>F-Varianten.

HisA <sub>rand</sub> F Variante	gefundene Austausche	lösliche Expression in <i>E. coli</i> [%]
HisAFwt	-	4,0 ± 2,3
#2	K13R, T25S, K113E	10,2 ± 0,5
#13	V36M, G81E, L112M	3,6 ± 0,2
#14	A6E	14,2 ± 0,7
#18	R98K	2,3 ± 0,2
#22	A6T, E37K	10,0 ± 2,6
#32	L2P, D8V, E41D, S59N	12,9 ± 1,5
#37	D8V	17,7 ± 1,7
#39	A15T	4,9 ± 0,4
#101	F72Y	5,7 ± 0,7

Bei der Umklonierung der HisA<sub>rand</sub>F-Variante #18 in pET21a wurde der konservative Austausch A4V (vgl. Tabelle 9) wieder entfernt (unter Verwendung des 5'*hisA*-NdeI-Primers).

Bei den HisA<sub>rand</sub>F-Varianten #14 und #37 reicht jeweils ein einzelner Austausch (A6E bzw. D8V) aus, um die Löslichkeit von HisAF etwa 4-fach zu erhöhen (Tabelle 10). Diese beiden Positionen sind auch in den Varianten #22 und #32 mutiert. Die zusätzlichen Austausche dieser Varianten führen allerdings zu einer leichten Verminderung der Löslichkeit im Vergleich zu den Einzelvarianten. In Variante #2 ist die Löslichkeit von HisAF durch die Austausche K13R, T25S und K113E etwa 2,5-fach verbessert.

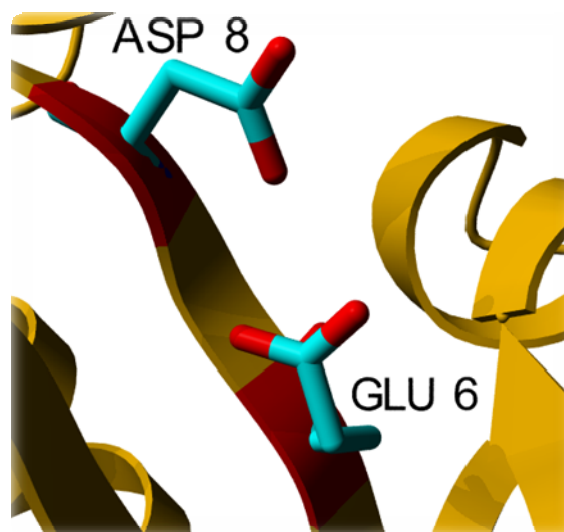
Die fünf erwähnten HisA<sub>rand</sub>F-Varianten mit der höchsten Löslichkeit (Abbildung 38 und Tabelle 10) wurden nach heterologer Expression in *E. coli* T7 Express Rosetta Zellen aus dem löslichen Überstand über Nickel-Chelat-Affinitätschromatografie gereinigt. Anschließend wurde die konformationelle Stabilität der Varianten durch Denaturierung in Harnstoff bestimmt (Abbildung 39).



**Abbildung 39: Vergleich der konformationellen Stabilität der isolierten HisA<sub>rand</sub>F-Varianten (grün) im Vergleich zu HisAFwt (schwarz).**

Die Messungen wurden in 50 mM KP, pH 7,5 bei 25 °C durchgeführt. Die Proben einer Messreihe enthielten 4,5 bis 5,5  $\mu$ M Protein. Das fluorimetrische Signal wurde über 15 s aufgenommen und gemittelt. Die Anregung erfolgte bei 280 nm und die Emission wurde bei 317 nm verfolgt. Die durchgezogenen Linien sollen das Auge führen.

Vergleicht man die Auffaltungen der fünf HisA<sub>rand</sub>F-Varianten, fällt auf, dass die Steigerung der Löslichkeit bei zwei Varianten mit einem deutlichen Verlust an konformationeller Stabilität verbunden ist. Dabei verschlechtert sich der  $[D]_{1/2}$ -Wert von 4,1 M auf 3,8 M für Variante #2 und auf 3,7 M für Variante #14. Die Destabilisierung von Variante #14 kann vermutlich mit einer elektrostatischen Abstoßung zwischen den negativ geladenen Seitenketten des eingeführten Glutamatrests 6 und des Aspartatrests 8 erklärt werden (Abbildung 40).



**Abbildung 40: Modell von HisAF-A6E.**

Blick auf  $\beta$ -Strang 1 des zentralen Fasses mit dem ausgetauschten Rest A6E und dem für die HisA-Aktivität katalytisch essenziellen Rest Asp8. Die Entfernung der Carboxylatgruppen von Glu6 und Asp8 beträgt 3 Å (YASARA).

Die mehrstufige Denaturierung von Variante #22 deutet auf Auffaltungsintermediate hin. Die Auffaltung der Variante #32 deckt sich praktisch mit der von HisAFwt. Eine deutliche Verbesserung in Hinblick auf Stabilität und Löslichkeit ist für die HisA<sub>rand</sub>F-Variante #37 zu beobachten. Im Vergleich zu HisAFwt ist der  $[D]_{1/2}$ -Wert bei vergleichbarer Kooperativität um etwa 1 M Harnstoff auf 4,9 M erhöht. Für diesen Stabilitäts- und Löslichkeitsgewinn ist alleine der Austausch D8V verantwortlich. In HisA handelt es sich bei Asp8 um einen der beiden katalytisch essenziellen Reste (Henn-Sax *et al.*, 2002). Damit steht dieses Ergebnis im Einklang mit einer früheren Arbeit, in der gezeigt werden konnte, dass katalytisch essenzielle Reste nicht für die Proteinstabilität optimiert sind (Shoichet *et al.*, 1995; Nagatani *et al.*, 2007; Reeves *et al.*, 2008).

Die Bestimmung des Oligomerisierungszustands von HisA<sub>rand</sub>F #2, #14, #22, #32 und #37 erfolgte mittels analytischer Gelfiltration. Dabei lieferten alle fünf HisA<sub>rand</sub>F-Varianten ebenso wie HisAFwt (Höcker, 2002) einen einzigen definierten Peak bei nahezu identischer Elutionszeit. Mit Hilfe einer Kalibrierungsgeraden wurden apparente Molekulargewichte von 25,5–27,4 kDa bestimmt, was dem berechneten Molekulargewicht des Monomers (29,1 kDa) entspricht.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch das *in vivo Screening* am FACS fünf HisA<sub>rand</sub>F-Varianten isoliert wurden, die in Abwesenheit von GFP eine verbesserte Löslichkeit in *E. coli* zeigen. Zusätzlich zeigte eine Variante (#37) eine deutlich verbesserte konformationelle Stabilität durch den Austausch des für die HisA-Reaktion katalytisch essenziellen Asp8 zu einem Valin.

Nachdem durch gerichtete Evolution vorteilhafte Austausche in HisAF gefunden werden konnten, sollten in einem weiteren Schritt gefundene Austausche durch gezielte Mutagenese miteinander kombiniert werden. Dadurch sollte die Löslichkeit und die Stabilität des Proteins weiter verbessert werden.

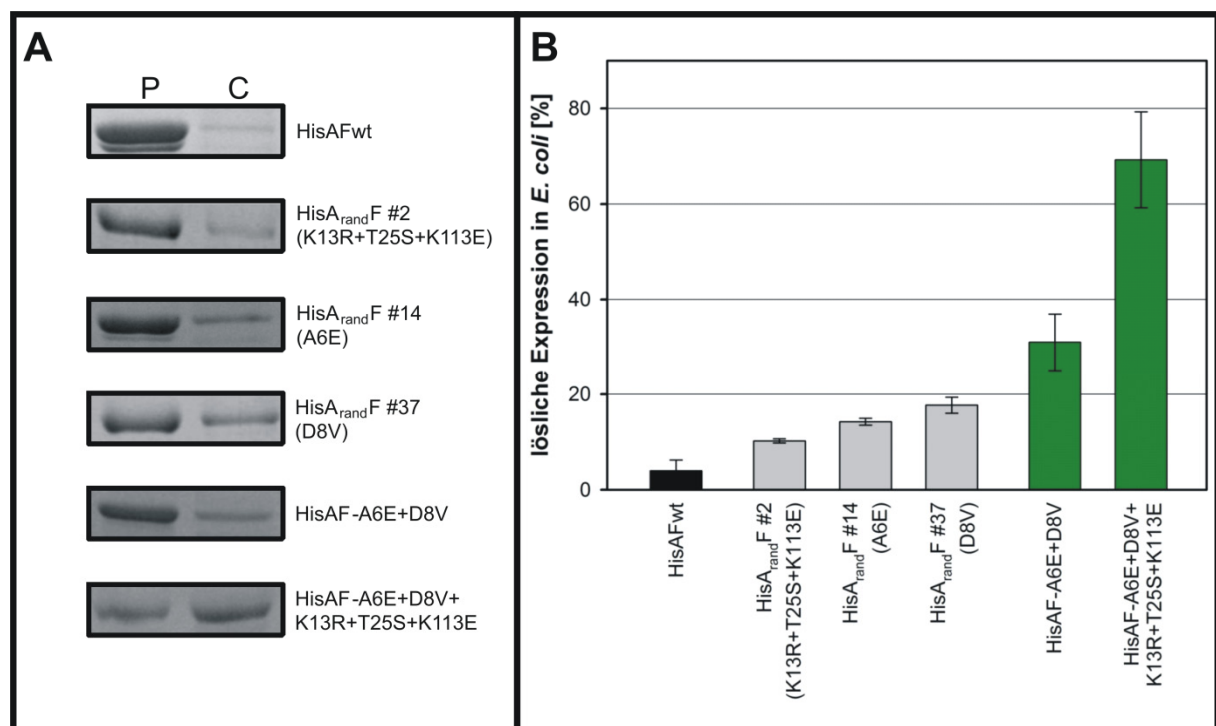
#### 4.3.2.2.2 Gezielte Kombination von Austauschen zur Verbesserung der Löslichkeit von HisAF

Betrachtet man die im *in vivo Screening* isolierten und anschließend charakterisierten HisA<sub>rand</sub>F-Varianten (Tabelle 10), dann bieten sich für eine Kombination von Austauschen folgende Varianten an:

1. HisAF-A6E+D8V (Kombination aus den Varianten #14 und #37)
2. HisAF-A6E+D8V+K13R+T25S+K113E (Kombination aus den Varianten #2, #14 und #37)

Die Klonierung von *hisAF*-A6E+D8V erfolgte mittels PCR mit den Primern 5'*hisA*-A6E+D8V und 3'*hisF*-*NotI* auf dem Templat pET24a-*hisAF*, welches keinen GSG-Linker zwischen dem *hisA*- und dem *hisF*-Teil besitzt. Die Klonierung von *hisAF*-A6E+D8V+K13R+T25S+K113E erfolgte auf dem Templat pET21a-*hisA*<sub>rand</sub>F-K13R+T25S+K113E, wobei der vorhandene GSG-Linker erhalten blieb. Beide Konstrukte wurden in pET21a über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *NotI* kloniert.

Zur Bestimmung der Löslichkeit der kombinierten HisA<sub>rand</sub>F-Varianten wurden Expressionen im analytischen Maßstab in *E. coli* T7 Express Rosetta Zellen durchgeführt (2.1). Anschließend erfolgte eine SDS-Gel Analyse der löslichen und unlöslichen Zellfraktion mittels OptiQuant (3.5.2.2; Abbildung 41).



**Abbildung 41: Löslichkeitsanalyse der kombinierten HisA<sub>rand</sub>F-Varianten (grün) im Vergleich zu den Ausgangsvarianten und HisAFwt.**

**A:** Unlösliche (P) und lösliche (C) Fraktionen *E. coli* T7 Express Rosetta Zellen mit den rekombinanten Proteinen (SDS-Gel; 12,5 % Polyacrylamid; gefärbt mit Commassie-blau).

**B:** Prozentanteil der löslich hergestellten Proteine, jeweils als Mittelwert aus der Analyse von drei verschiedenen Klonen. Proteinbanden aus einer SDS-Gel Analyse der Proteine wurden fotografiert und ihre Intensitäten mittels OptiQuant bestimmt (3.5.2.2).

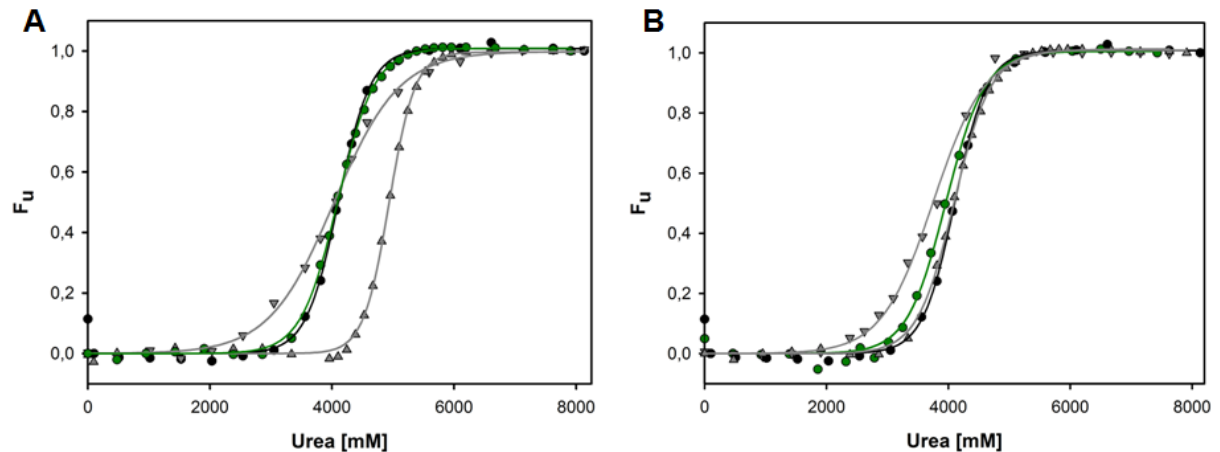
Durch die Kombination von gefundenen Austauschen im *in vivo Screening* wurde die Löslichkeit auf 31 % für HisAF-A6E+D8V und auf 69 % für HisAF-A6E+D8V+K13R+T25S+K113E gesteigert. Im Vergleich zu HisAFwt stellt das eine ca. 8- bzw. 17-fache Verbesserung dar. Auffällig ist, dass sich die Effekte in Bezug auf die Proteinlöslichkeit bei der Variante HisAF-A6E+D8V im Vergleich zu den Einzelaustauschen in etwa addieren, während der Einfluss der zusätzlichen Austausche K13R+T25S+K113E in Verbindung mit A6E+D8V als synergistisch beurteilt werden kann (Abbildung 41B). Dabei muss jedoch beachtet werden, dass die Gesamtproteinmenge insbesondere bei HisAF-A6E+D8V+K13R+T25S+K113E im Vergleich zu HisAFwt und anderen HisA<sub>rand</sub>F-Varianten reduziert ist (Abbildung 41A). Dies drückt sich in den Ausbeuten der Proteinreinigung aus (Tabelle 11).

**Tabelle 11: Ausbeuten bei der Reinigung von mittels FACS isolierten HisA<sub>rand</sub>F-Varianten und der daraus kombinierten HisAF-Varianten.**

Die Expression erfolgte jeweils in einem Volumen von 1 l TB-Medium. Die Konzentrationen bzw. Ausbeuten wurden durch Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt, wofür  $\epsilon_{280}$  aus der Aminosäuresequenz berechnet wurde (Pace *et al.*, 1995). Da das Nassgewicht der Zellen nicht bestimmt wurde, kann keine Normierung auf die Zellmasse erfolgen.

Protein	Ausbeute aus 1 l Kultur [mg]
HisA <sub>rand</sub> F #2 (K13R+T25S+K113E)	24,9
HisA <sub>rand</sub> F #14 (A6E)	37,8
HisA <sub>rand</sub> F #37 (D8V)	123,8
HisAF-A6E+D8V	106,2
HisAF-A6E+D8V+K13R+T25S+K113E	20,5

Um den Einfluss der kombinierten Austausche auf die Proteinstabilität zu untersuchen, wurde diese durch Denaturierung in Harnstoff bestimmt (Abbildung 42).



**Abbildung 42: Vergleich der konformationellen Stabilität von HisAF-A6E+D8V (A; ●) und HisAF-A6E+D8V+K13R+T25S+K113E (B; ●) im Vergleich zu den Ausgangskonstrukten und HisAFwt (●).**

**A:** Als Ausgangskonstrukte sind HisA<sub>rand</sub>F #14 (A6E; ▼) und HisA<sub>rand</sub>F #37 (D8V; ▲) gezeigt.

**B:** Als Ausgangskonstrukte sind HisA<sub>rand</sub>F #2 (K13R+T25S+K113E; ▼) und HisAF-A6E+D8V (▲) gezeigt.

Die Messungen wurden in 50 mM KP, pH 7,5 bei 25 °C durchgeführt. Die Proben einer Messreihe enthielten 4,5 bis 5,5 µM Protein. Das fluorimetrische Signal wurde über 15 s aufgenommen und gemittelt. Die Anregung erfolgte bei 280 nm und die Emission wurde bei 317 nm verfolgt.

Abbildung 42A zeigt, dass die destabilisierende Wirkung von zwei negativ geladenen Aminosäuren im  $\beta$ -Strang 1 (vgl. Abbildung 40) durch den zusätzlichen Austausch D8V kompensiert wird. Dadurch zeigt HisAF-A6E+D8V unter Gewinnung von Proteinlöslichkeit (Abbildung 41) identische Stabilitätseigenschaften wie HisAFwt.

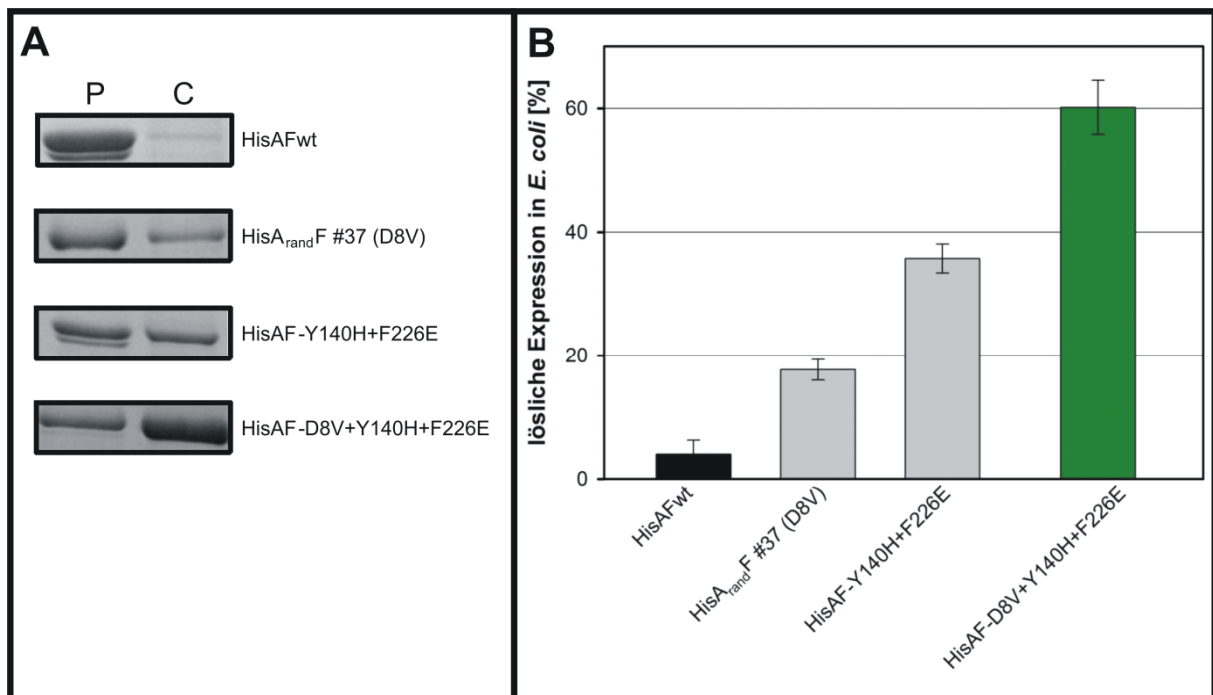
HisAF-A6E+D8V+K13R+T25S+K113E ist im Vergleich zu HisAFwt minimal destabilisiert (Abbildung 42B), die Proteinlöslichkeit ist aber um das 17-fache erhöht (Abbildung 41B). Kompensiert wird der Effekt der erhöhten Löslichkeit jedoch durch ein geringeres Expressionslevel dieser Variante (Abbildung 41A und Tabelle 11). Hier würde sich eine Vereinzelung der Austausche K13R, T25S und K113E anbieten, um den Einfluss jedes einzelnen Austauschs zu quantifizieren.

Aufgrund der bisher gefundenen Ergebnisse ist der gefundene Austausch D8V die herausragende Position. Durch diesen Austausch wird die Proteinlöslichkeit deutlich erhöht und gleichzeitig eine Stabilisierung von HisAF erzielt (Abbildung 39, Abbildung 41 und Tabelle 11).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die weiteren HisA<sub>rand</sub>F-Varianten #13, #18, #39 und #101 nicht näher untersucht, was jedoch in Kürze erfolgen soll.

#### 4.4 Gezielte Kombination von Austausch aus rationalem Design und gerichteter Evolution, welche die Löslichkeit und Stabilität von HisAF erhöhen

Um eine in Hinblick auf Löslichkeit und Stabilität optimierte HisAF-Variante zu generieren, wurde der Austausch D8V aus dem *in vivo Screening* mit den aus rationalem Design gewonnenen Austauschen F226E (4.2) und Y140H (4.2.2) kombiniert. Dazu wurde zunächst mit pET21a-*hisAF*-Y140H als Templat und den endständigen Genprimern 5'*hisA*-NdeI und 3'*hisF*-F229E durch PCR die Variante *hisAF*-Y140H+F226E erzeugt, welche in pET21a über NdeI und NotI kloniert wurde. Mit dieser Variante als Templat wurde mittels PCR und den Primern 5'*hisA*-D8V und 3'*hisF*-NotI *hisAF*-D8V+Y140H+F226E amplifiziert, welches ebenfalls über NdeI und NotI in pET21a kloniert wurde. Die so erzeugte Variante HisAF-D8V+Y140H+F226E zeigt eine Proteinlöslichkeit von 60 % in *E. coli* T7 Express Rosetta Zellen (Abbildung 43).



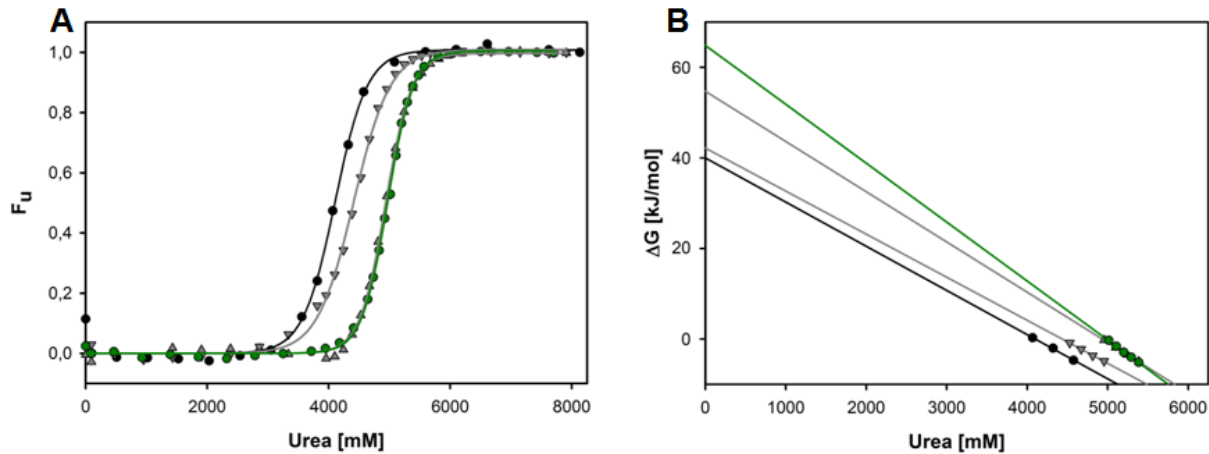
**Abbildung 43: Löslichkeitsanalyse der kombinierten Variante HisAF-D8V+Y140H+F226E (grün) im Vergleich zu den Ausgangsvarianten (grau) und HisAFwt (schwarz).**

**A:** Unlösliche (P) und lösliche (C) Fraktionen von *E. coli* T7 Express Rosetta Zellen mit den rekombinanten Proteinen (SDS-Gel; 12,5 % Polyacrylamid; gefärbt mit Commassie-blau).

**B:** Prozentanteil der löslich hergestellten Proteine, jeweils als Mittelwert aus der Analyse von drei verschiedenen Klonen. Proteinbanden aus einer SDS-Gel Analyse der Proteine wurden fotografiert und ihre Intensitäten mittels OptiQuant bestimmt (3.5.2.2).



Die konformationelle Stabilität von HisAF-D8V+Y140H+F226E wurde durch Denaturierung in Harnstoff bestimmt (Abbildung 44A) und daraus die thermodynamische Stabilität  $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$  abgeleitet (Abbildung 44B).



**Abbildung 44: Vergleich der konformationellen Stabilität (A) von HisAF-D8V+Y140H+F226E (●) mit den Ausgangskonstrukten HisAF-D8V (▲) und HisAF-Y140H+F226E (▼) und HisAFwt (●) durch Denaturierung in Harnstoff und daraus abgeleitete thermodynamische Stabilitäten  $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$  (B).**

Die Messungen wurden in 50 mM KP, pH 7,5 bei 25 °C durchgeführt. Die Proben einer Messreihe enthielten 4,5 bis 5,5  $\mu\text{M}$  Protein. Das fluorimetrische Signal wurde über 15 s aufgenommen und gemittelt. Die Anregung erfolgte bei 280 nm und die Emission wurde bei 317 nm verfolgt.

**A:** Die Auffaltungen von HisAF-D8V und HisAF-D8V-Y140H+F226E sind nahezu deckungsgleich. Die durchgezogenen Linien sollen das Auge führen.

**B:** Bestimmung der thermodynamischen Stabilität  $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$  durch Extrapolation der Daten aus dem Übergangsbereich auf [Urea] = 0 M unter Annahme des Zweizustandsmodells (3.5.5). Die Qualität der Regressionsgeraden betrug für die gezeigten Varianten  $R^2 > 0,99$ . Die ermittelten  $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ -Werte sind in Tabelle 12 aufgelistet. Die Farb- und Symbolcodierung entspricht der aus (A).

Abbildung 44A zeigt, dass der  $[D]_{1/2}$ -Wert der kombinierten Variante HisAF-D8V+Y140H+F226E dem von HisAF-D8V entspricht. Die Auswertung der Auffaltungskurven unter der Annahme des Zweizustands-Modells ergab jedoch eine leichte Erhöhung des  $m^{\text{app}}$ -Wertes von 11,1 auf 13,0  $[\text{kJ/mol}\cdot\text{M}]$  und damit auch einen Anstieg von  $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$  um 10,1 kJ/mol (Tabelle 12). Die beiden zusätzlichen Austausche Y140H+F226E führen also im Kontext von D8V zu einer leichten Stabilisierung von HisAF.

**Tabelle 12: Vergleich der Stabilität von HisAFwt, HisAF-D8V, HisAF-Y140H+F226E und HisAF-D8V+Y140H+F226E nach Denaturierung der Proteine in Harnstoff.**

HisAF-Variante	$m^{\text{app}}$ [kJ/(mol·M)]	$[D]_{1/2}$ [M]	$\Delta G^{\text{app}}(\text{H}_2\text{O})$ [kJ/mol]	$\Delta\Delta G^{\text{app}}$ [kJ/mol]
wt	9,7 (8,6) <sup>a</sup>	4,1 (4,0) <sup>a</sup>	39,9 (34,8) <sup>a</sup>	0,0
D8V	11,1	4,9	54,7	-14,8
Y140H+F226E	9,5	4,4	42,2	-2,3
D8V+Y140H+F226E	13,0	5,0	64,8	-24,9

$m^{\text{app}}$  und  $\Delta G^{\text{app}}(\text{H}_2\text{O})$  wurden unter Annahme des Zweizustands-Modells ermittelt (3.5.5).

<sup>a</sup>: Die Daten in Klammern stammen aus Höcker (2002).

Für HisAFwt konnte bereits gezeigt werden, dass es sich dabei um ein Protein mit beträchtlicher Stabilität handelt und zudem eine sehr kooperative Auffaltung zeigt (Höcker *et al.*, 2004). Die in Tabelle 12 aufgelisteten Werte zeigen, dass durch die gezielte Kombination von Austausch HisAF-Varianten erzeugt werden konnten, in der die Stabilität des Proteins und die Kooperativität der Entfaltung deutlich gesteigert wurde. Die meisten in der Natur auftretenden globulären Proteine weisen eine konformationelle Stabilität von 21–63 kJ/mol auf (Pace, 1990), womit der  $\Delta G^{\text{app}}(\text{H}_2\text{O})$ -Wert von HisAF-D8V+Y140H+F226E am oberen Bereich der Stabilität natürlich evolvierter Proteine liegt. Auch im Hinblick auf die Proteinlöslichkeit wurde durch die Kombination der Austausche D8V+Y140H+F226E ein sehr deutlicher Fortschritt erzielt. Während HisAFwt nahezu unlöslich in *E. coli* Zellen hergestellt wird, erhöht sich die Proteinlöslichkeit für HisAF-D8V+Y140H+F226E auf 60 % (Abbildung 43).

Diese Variante wurde in einer Konzentration von 23,4 mg/ml in 5 mM KP, pH 7,5 an Dr. Birte Höcker zum Kristallisieren verschickt. Sie konnte jedoch kein Proteinkristallwachstum beobachten.

#### 4.5 Screening nach einer stabilisierten HisFA-Variante durch Fusion an GFP

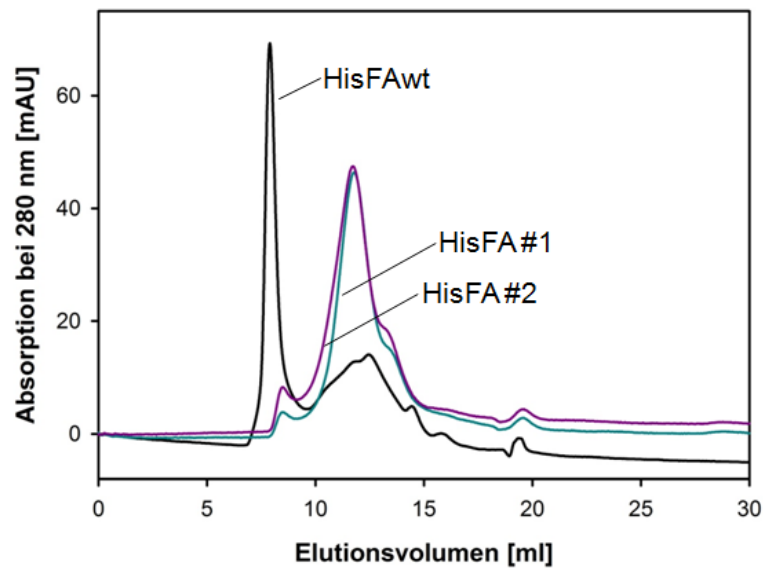
In gleicher Weise wie für HisAF sollte für HisFA eine Stabilisierung und eine Verbesserung der Proteinlöslichkeit durch Fusion an GFP und anschließendes *in vivo Screening* erreicht werden. Dazu wurden zwei pER13a-basierte Genbanken in *E. coli* XL1 Blue MRF' Zellen hergestellt. Die erste Genbank umfasste ca.  $7,0 \cdot 10^5$  Varianten und eine Mutationsrate von 1–4 Austauschen pro Gen. Die zweite

Genbank umfasste ca.  $1,5 \cdot 10^5$  Varianten und eine sehr heterogene Mutationsrate von 1–16 Mutationen pro Gen. Die Herstellung dieser zweiten Genbank erfolgte durch einen Standard-PCR-Ansatz, dem 0,375 mM  $\text{MnCl}_2$  zugesetzt waren.

Mit beiden Genbanken wurden BL21(DE3) Zellen transformiert. Das FACS-*Screening* erfolgte wie bereits beschrieben (4.3.2.1), wobei eine Induktion der Proteinexpression mit IPTG nicht erforderlich war. Mit der ersten Genbank konnte keine Anreicherung von HisFA-Varianten erreicht werden. Mit der zweiten Genbank konnte nach drei Anreicherungsrounds eine deutliche Rechtsverschiebung des Hauptpeaks im FACS beobachtet werden. Aus diesem nach rechts verschobenen Peak wurden insgesamt 448 Zellen auf  $\text{LB}_{\text{kan}}$ -Agarplatten vereinzelt. Da die Zellen für die Proteinexpression nicht mit IPTG induziert werden mussten, wurden die Agarplatten für fünf Tage bei 4 °C gelagert, was zu einer Intensivierung der GFP-Fluoreszenz führt, und anschließend unter UV-Licht analysiert. Danach wurden die 69 Kolonien mit der stärksten GFP-Fluoreszenz ausgewählt und über Kolonie-PCR analysiert, wovon 21 ein Fragment erwarteter Größe enthielten. Mit diesen wurden Expressionen im analytischen Maßstab und FACS-Läufe durchgeführt sowie Fluoreszenzspektren aufgenommen. Die Sequenz von 15 Klonen wurde analysiert. Dabei wurden zwei verschiedene HisFA-Varianten gefunden:

- HisFA-Variante #1 (13 von 15 Sequenzen):  
V17A, F23Y, N25S, L35N, K37E, F49S, E64D, D148G, L153P, H178R, A190D, V223G und V236G
- HisFA-Variante #2 (2 von 15 Sequenzen):  
E46G, L50P, T88A, I113V, L142P, L153P, L156P, I186V, V192A, L234P

In beiden Sequenzen waren zusätzlich jeweils drei stille Mutationen enthalten. Beide Varianten wurden in pER14a (2.2.2) umklont und im analytischen Maßstab ohne GFP exprimiert. Da dabei für beide Varianten kein Protein im löslichen Zellüberstand gefunden wurde, wurden die Proteine nach Expression im präparativen Maßstab durch Rückfaltung aus der unlöslichen Zellfraktion und anschließende Nickel-Chelat-Affinitätschromatografie gereinigt. Mit dem gereinigten Protein wurden analytische Gelfiltrationsläufe durchgeführt (Abbildung 45).



**Abbildung 45: Analytische Gelfiltration der HisFA Varianten #1 und 2 im Vergleich zu HisFAwt.**

Es wurden jeweils ca. 500 µg Protein auf eine Superdex-75 Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte bei RT in 50 mM KP, pH 7,5, 300 mM KCl, und wurde bei 280 nm verfolgt.

Die Elution von HisFAwt erfolgt bei ca. 8 ml im Ausschlussvolumen und anschließend über einen breiten Bereich, der bei 45,4 kDa sein Maximum hat. Der Anteil höhermolekularer Aggregate im Ausschlussvolumen geht bei den HisFA-Varianten #1 und #2 deutlich zurück; die Hauptpeaks entsprechen apparenten Molekulargewichten von 71,5 kDa bzw. 73,3 kDa. Bei einem berechneten Molekulargewicht von 28,0 kDa entspräche dies in etwa dem Trimer, was jedoch unwahrscheinlich erscheint. Zur genaueren Analyse des Oligomerisierungszustandes sollten Gleichgewichtsläufe in der analytischen Ultrazentrifugation durchgeführt werden, was jedoch im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht mehr möglich war. Eine Verbesserung der konformationellen Stabilität konnte für beide Varianten nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Da beide Varianten zahlreiche Mutationen enthielten, wurden einige Austausche ausgewählt und vereinzelt, um mögliche positive Effekte besser einordnen zu können. Es wurden folgende Einzelvarianten hergestellt: HisFA-F23Y, HisFA-K37E, HisFA-F49S, HisFA-L153P und HisFA-A190D. Diese fünf Varianten wurden hinsichtlich ihrer Löslichkeit untersucht, wobei jedoch im Vergleich zu HisFAwt keine Verbesserung festgestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Daraufhin wurden die Arbeiten mit HisFA eingestellt.

## 4.6 Etablierung von TrpF-Aktivität auf der Chimäre HisAF

In früheren Arbeiten konnte sowohl auf dem HisA- als auch auf dem HisF-Gerüst TrpF-Aktivität etabliert werden (Jürgens *et al.*, 2000; Leopoldseder *et al.*, 2004). In HisA und HisF sind die Aspartatreste an den C-terminalen Enden der  $\beta$ -Stränge 1 (Asp8 bzw. Asp11) und 5 (Asp127 bzw. Asp130) essenziell für die Katalyse (Henn-Sax *et al.*, 2002; Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001). Die Etablierung der TrpF-Aktivität erfolgte durch Substitution von Asp127 (HisA) bzw. Asp130 (HisF) gegen jeweils ein Valin bzw. eine nicht-negativ geladene Aminosäure (Leopoldseder *et al.*, 2004).

Da keine Strukturinformationen für HisAF vorlagen, sollte die Etablierung von TrpF-Aktivität durch gerichtete molekulare Evolution erfolgen. Dazu wurde durch Zufallsmutagenese *in vitro* mittels epPCR das *hisAF* Gen randomisiert (3.3.7.4). Aus früheren Arbeiten war bekannt, dass HisAF vorwiegend unlöslich in der Zelle exprimiert wird (Höcker, 2002). Damit sichergestellt war, dass die HisAF-Varianten in löslicher Form in der Zelle vorliegen und somit gegebenenfalls die TrpF-Defizienz komplementieren können, wurde die *hisAF*-Genbank C-terminal an *malE* (Maltose-Binde-Protein) fusioniert. Dieses Vorgehen basiert auf der Beobachtung, dass viele, als *inclusion bodies* anfallende Proteine durch Fusion mit MBP in löslicher Form in der Zelle vorliegen (Kapust & Waugh, 1999; Fox & Waugh, 2003).

### 4.6.1 Erstellung einer Genbank auf *hisAF*

Zur Erstellung einer Genbank auf *hisAF* wurde zunächst *malE* einschließlich dem multiplen Klonierungsbereich (*Multiple Cloning Site*, MCS) aus dem Vektor pMAL-c2 mit den Primern 5'*malE*-*SphI* und 3'*pMAL-c2(lacZ)* herausamplifiziert. Dabei wurde am 5'-Ende von *malE* eine *SphI*-Restriktionsschnittstelle eingefügt. Mit Hilfe dieser Schnittstelle und der am 3'-Ende der MCS gelegenen *HindIII*-Schnittstelle wurde *malE*+MCS in den pTNA-Vektor eingefügt. Anschließend wurde *hisAF* mit Hilfe der Primer 5'*hisA*-*BamHI* und 3'*hisF*-*HindIII* und dem Templat pET24a-*hisAF* amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen für *BamHI* und *HindIII* der MCS in den Vektor pTNA-*malE*+MCS kloniert.

Zur Randomisierung von *hisAF* wurde die Methode der epPCR unter Verwendung unausgeglichener dNTP-Konzentrationen und unter Zugabe von 0,6 mM  $\text{MnCl}_2$  gewählt (3.3.7.4). Die PCR wurde mit den genflankierenden Primern

5'*malE*\_ter\_*Bam*HI und 3'*pTNA-Hind*III durchgeführt. Als Templat wurden pro *ep*PCR-Ansatz 25 ng *pTNA-malE-hisAF* DNA eingesetzt. Aufgrund der Fusion von *hisAF* an *malE* wurde auf das ATG-Startcodon von *hisAF* verzichtet. Ansonsten unterlag das gesamte *hisAF*-Gen aufgrund der Wahl flankierender Primer der Randomisierung. Um für die anschließende Klonierung eine ausreichend große Menge an randomisierten *hisAF*-Gen zu erhalten, wurden drei *ep*PCRs mit jeweils einem Gesamtvolumen von 50 µl angesetzt (3.3.7.4). Die Amplifikationsprodukte wurden über Agarosegelelektrophorese (2.12.4) analysiert, aus dem Gel ausgeschnitten und über drei Säulen mit dem Nucleospin®II-Kit (Macherey-Nagel) aufgereinigt. Die drei gereinigten PCR-Produkte und 2 µg des Vektors *pTNA-malE*+MCS wurden in einem sequenziellen Verdau zunächst mit *Bam*HI für 2 h bei 37 °C inkubiert, über ein Agarosegel analysiert, gereinigt und anschließend über Nacht bei 37 °C mit *Hind*III inkubiert. Die Analyse erfolgte über Agarosegelelektrophorese und anschließender Reinigung mit dem Nucleospin®II-Kit. Die verdauten und gereinigten Amplifikationsprodukte wurden vereinigt und anschließend in fünf identischen Ansätzen mit dem verdauten und gereinigten *pTNA-malE*+MCS Vektor ligiert (3.3.4.2) und dialysiert (3.2.5). Aus den vereinigten Ligationsansätzen wurden je 5 µl zur Transformation von 18-mal 100 µl frisch hergestellten elektrokompenten (3.2.4) *E. coli* XL1 Blue MRF' Zellen (Stratagene) verwendet (2.1). Die transformierten Zellen wurden mit je 1,5 ml SOC-Medium aus der Elektroporationsküvette gespült und 1 h bei 37 °C und 220 rpm gekurt. Nach der Kur wurden die Zellen abzentrifugiert (EPPENDORF 5810R 4000 rpm, 10 min, 25 °C), in insgesamt 10 ml SOC-Medium aufgenommen und auf 50 großen SOC<sub>Amp</sub>-Platten (Ø 14,5 cm) ausplattiert (pro Platte 200 µl Zellsuspension). Kleine Aliquots wurden in verschiedenen Verdünnungen auf kleinen SOC<sub>Amp</sub>-Platten ausgestrichen. Über die Auszählung der auf diesen Platten gewachsenen Kolonien konnte abgeschätzt werden, dass sich auf den 50 großen SOC<sub>Amp</sub>-Platten etwa  $1,1 \cdot 10^6$  unabhängige Klone befanden. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz der verwendeten Zellen wurden 100 µl der elektrisch kompetenten *E. coli* XL1 Blue MRF' Zellen mit 100 ng *pTNA-malE* transformiert. Nach Ausplattierung in verschiedenen Verdünnungen auf kleinen SOC<sub>Amp</sub>-Platten wurde die Transformationseffizienz auf etwa  $2,7 \cdot 10^{11}$  cfu/µg abgeschätzt. Mit 20 Kolonien der Genbank wurde eine Kolonie-PCR mit den Primern 5'*pMAL*-c2(*malE*) und 3'*CyPst*I durchgeführt, wodurch die Ligationseffizienz auf 100 % bestimmt werden konnte. Zur Überprüfung der Anzahl

und Verteilung der Mutationen wurden 10 Klone vollständig sequenziert und mit der *hisAF*-Ausgangssequenz verglichen (Tabelle 13). Dabei fanden sich pro Sequenz zwischen zwei und sieben Basenaustausche. Somit ergibt sich die Größe der Genbank für pTNA-*malE-hisAF* zu  $1,1 \cdot 10^6$  unabhängiger Varianten. Zur Gewinnung der Genbank wurden alle Kolonien der 50 großen SOC<sub>Amp</sub>-Platten mit Hilfe von flüssigem LB-Medium und einem sterilen Spatel abgeschabt. Die so gewonnene Zellmasse wurde abzentrifugiert (EPPENDORF 5810R 4000 rpm, 10 min, 4 °C) und das Plasmidgemisch im präparativen Maßstab isoliert (vier Midi-Präparationen, 3.3.1.2).

**Tabelle 13: Anzahl und Verteilung der Nukleotid-Austausche bei zehn zufällig ausgewählten Klonen der *hisAF* Genbank zur Etablierung von TrpF-Aktivität.**

		<i>malE-hisAF</i> Genbank nach <i>epPCR</i>	
Zahl der Austausche		38 bei 10 Klonen	
Austausche/ <i>hisAF</i>		3,8	
Ts	AT → GC	13	34 %
	GC → AT	19	50 %
Tv	AT → TA	3	8 %
	AT → CG	1	3 %
	GC → CG	0	0 %
	GC → TA	2	5 %
AT-Austausche		17	45 %
GC-Austausche		21	55 %
AT → GC / GC → AT		0,8	-
Ts/Tv		5,3	-

Ein Klon enthielt zusätzlich eine Deletion. Im Einzelfall wurden 2 bis 7 Basenaustausche pro Sequenz ermittelt. Ts: Transitionen; Tv: Transversionen

Anhand Tabelle 13 kann von einer sehr ausgewogenen Mutationsverteilung ausgegangen werden. Das Verhältnis von AT-Austauschen zu GC-Austauschen ist in etwa ausgeglichen, während Transitionen im Vergleich zu Transversionen überwiegen.

Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Aminosäure ausgetauscht wird, beträgt an Position eins eines Codons 96 %, an Position zwei 99 % und an Position drei 32 %. Durchschnittlich ergibt dies eine Wahrscheinlichkeit von 75 %, dass ein

Basenaustausch den Austausch einer Aminosäure zur Folge hat. Das bedeutet, dass mit den 3,8 Nukleotidaustauschen pro Gen in der *hisAF*-Genbank im Durchschnitt 2,9 Aminosäureaustausche erzeugt würden.

#### **4.6.2 Komplementation von $\Delta trpF$ -Zellen mit der pTNA-*malE*-*hisAF* Genbank**

Zur Selektion von HisAF-Varianten, die durch Aminosäureaustausche die *trpF*-Defizienz der  $\Delta trpF$ -Zellen komplementieren können, wurden zweimal 100  $\mu$ l kompetenter  $\Delta trpF$ -Zellen durch Elektroporation mit jeweils 100 ng der pTNA-*malE*-*hisAF*-Genbank transformiert. Als Positivkontrolle wurde pTNA-*trpF* (Claren, 2003), als Negativkontrollen wurden pTNA-*malE* und pTNA-*malE*-*hisAF* eingesetzt. Die nach der Kur in 1 % NaCl gewaschenen Zellen wurden auf M9<sup>-</sup><sub>Amp</sub>-Medium (Selektionsbedingungen) und zusätzlich auf LB<sub>Amp</sub>-Medium (Nichtselektionsbedingungen) ausplattiert.

Unter nichtselektiven Bedingungen (LB<sub>Amp</sub>) wurden die Kontrollen und die Genbank in Verdünnungen von 1:10 bis 1:10.000 ausgestrichen. Aus der Anzahl der gewachsenen Kolonien konnte eine Transformationseffizienz von  $2,0 \cdot 10^6$  bis  $5,0 \cdot 10^7$  für die Kontrollen und von  $7,0 \cdot 10^6$  cfu/ $\mu$ g für die Genbank ermittelt werden. Damit liegt die Transformationseffizienz der  $\Delta trpF$ -Zellen mit der pTNA-*malE*-*hisAF*-Genbank nur um etwa einen Faktor 6–7 über der Größe der Genbank ( $1,1 \cdot 10^6$  unabhängige Varianten; 4.6.1). Da nur zweimal 100 ng der Genbank zur Transformation eingesetzt wurden, könnte eventuell nicht das gesamte Repertoire der Genbank beim Komplementationstest repräsentiert sein.

##### **4.6.2.1 Ergebnis der Selektion auf M9<sup>-</sup><sub>Amp</sub>-Selektionsplatten und im M9<sup>-</sup><sub>Amp</sub>-Flüssigselektionsmedium**

Es wurden jeweils 50  $\mu$ l der Positiv- und Negativkontrollen sowie der Genbank unverdünnt und 1:100 verdünnt in unterschiedliche Sektoren von großen M9<sup>-</sup><sub>Amp</sub>-Selektionsplatten ( $\varnothing$  14,5 cm) ausgestrichen. Zusätzlich wurden 200  $\mu$ l der Negativkontrolle pTNA-*malE* auf einer M9<sup>-</sup>-Selektionsplatte unverdünnt und jeweils 200  $\mu$ l der Negativkontrolle pTNA-*malE*-*hisAF* auf zwei M9<sup>-</sup><sub>Amp</sub>-Selektionsplatten unverdünnt und 1:100 verdünnt ausplattiert. Von der Genbank wurden jeweils 200  $\mu$ l



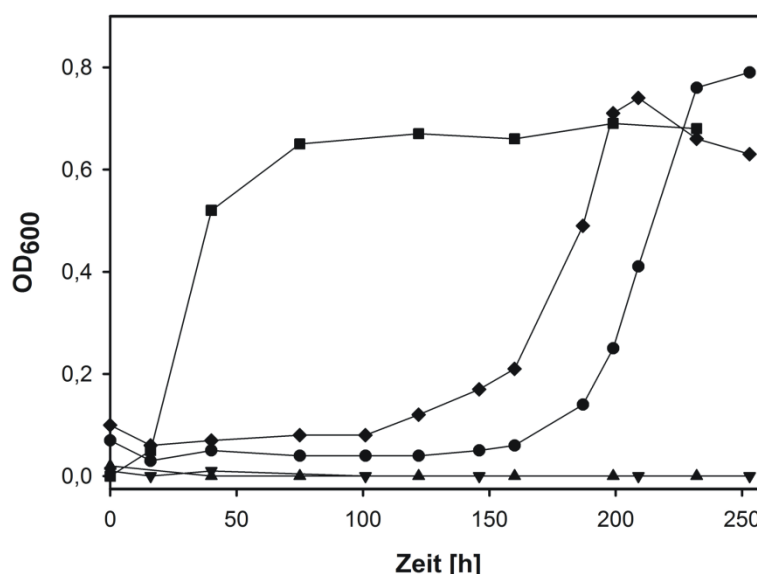
unverdünnt auf vier Selektionsplatten und in den Verdünnungen 1:5 (fünf Selektionsplatten) und 1:10 (zwei Selektionsplatten) ausplattiert. Alle Platten wurden bei 37 °C inkubiert und zu verschiedenen Zeiten nach Ausplattieren analysiert. Neu auftretende Kolonien wurden gezählt und markiert.

Bei der Positivkontrolle pTNA-*trpF* war bereits nach 16 h auf der mit unverdünnten Zellen bestrichenen Selektionsplatte und der Platte mit der 1:100 Verdünnung deutliches Koloniewachstum zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt war auf den Selektionsplatten der Negativkontrollen pTNA-*maI*E und pTNA-*maI*E-*hisAF* sowie der pTNA-*maI*E-*hisAF*-Genbank kein Koloniewachstum feststellbar.

Nach 187 h waren auf den Selektionsplatten mit der Genbank drei Kolonien sichtbar (eine Kolonie auf einer Platte mit der unverdünnten Genbank, zwei Kolonien auf jeweils einer Platte mit der Genbank in 1:10 Verdünnung). Nach 253 h wurden 16 weitere Kolonien auf den Selektionsplatten mit der Genbank gezählt. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die Negativkontrollen kein Wachstum. Mit den gewachsenen Kolonien der Genbank wurden jeweils 5 ml LB<sub>Amp</sub>-Medium angeimpft. Es zeigte sich, dass alle nach 187 h sichtbaren, jedoch nur zwei der nach 253 h neu hinzugekommenen Kolonien anwuchsen. Nach 253 h wurde der Komplementationstest beendet und die Selektionsplatten bei 4 °C gelagert. Somit wurden insgesamt fünf Klone aus dem Komplementationstest auf M9<sup>-</sup><sub>Amp</sub>-Selektionsplatten gesichert und deren Sequenz bestimmt (Tabelle 14).

Parallel zu dem Komplementationstest auf Selektionsplatten wurde ein Komplementationstest in M9<sup>-</sup><sub>Amp</sub>-Flüssigselektionsmedium durchgeführt. Dazu wurden jeweils einmal 50 ml Flüssigselektionsmedium mit 500 µl der 1:10 Verdünnungen der Positiv- und Negativkontrollen angeimpft. Mit jeweils 500 µl der Genbank wurden einmal 50 ml Flüssigselektionsmedium unverdünnt und einmal 1:10 verdünnt angeimpft. Die Inkubation der Kulturen erfolgte bei 37 °C und 220 rpm. Zu regelmäßigen Zeitpunkten wurden 800 µl der jeweiligen Kultur für eine OD<sub>600</sub>-Bestimmung entnommen. Bereits nach 75 h erreichte die Positivkontrolle die stationäre Phase bei OD<sub>600</sub> = 0,67 (Abbildung 46). Dagegen zeigten innerhalb des Beobachtungszeitraums von 253 h die Negativkontrollen kein Wachstum. Für die beiden Kulturen mit der Genbank wurde nach 122 h (für die Kultur, die mit 500 µl der unverdünnten Genbank angeimpft wurde) bzw. nach 187 h (für die Kultur, die mit 500 µl der 1:10 verdünnten Genbank angeimpft wurde) Wachstum beobachtet. Die

stationäre Phase erreichten beide Kulturen nach 199 bzw. nach 232 h (Abbildung 46).



**Abbildung 46: Wachstumskurven von *E. coli*  $\Delta trpF$ -Zellen in  $M9_{Amp}^-$ -Selektionsmedium nach Transformation mit verschiedenen in pTNA klonierten Genkonstrukten.**

$\Delta trpF$ -Zellen wurden mit folgenden pTNA-Konstrukten transformiert: *trpF* (■, Positivkontrolle), *malE* und *malE-hisAF* (▲ und ▼, Negativkontrollen), *malE-hisAF* Genbank unverdünnt (◆) und 1:10 verdünnt (●).

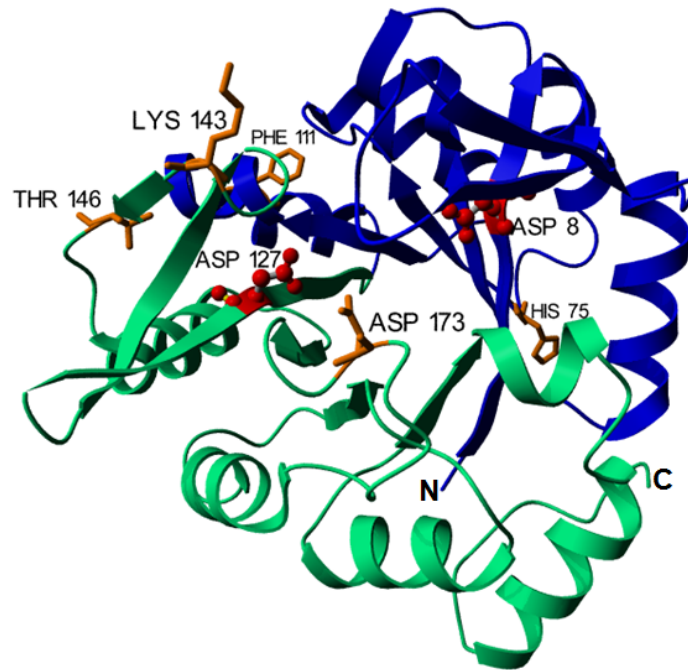
Zur Gewinnung von Einzelkolonien wurden von beiden Kulturen der Genbank jeweils 100  $\mu$ l entnommen, mit LB-Medium versetzt und in verschiedenen Verdünnungen auf  $LB_{Amp}$  ausplattiert. Von jeder Kultur wurden von jeweils drei Klonen Mini-Präparationen zur Isolierung der Plasmid-DNA durchgeführt und anschließend die DNA-Sequenz des *hisAF*-Genbereichs vollständig bestimmt (Tabelle 14).

**Tabelle 14: Ergebnis der Komplementation von  $\Delta trpF$ -Zellen mit der pTNA-*malE-hisAF*-Genbank.**

Zeit [h]	$M9_{Amp}^-$ -Platte/ Flüssigmedium	HisAF-Variante
ab 122	Flüssig (3/3)	N54Y, L112P
ab 187	Flüssig (3/3)	A6V, K143E, T146M, D173V, A197V
187	Platte	S59N, H75Y, V101M, K143R
187	Platte	D173V
187	Platte	F111L, D127V, D173V, H241R
253	Platte	H75Y, D108E, D173G
253	Platte	A88V, S169C, A217V

Für die aus  $M9_{Amp}^-$ -Flüssigselektionsmedium isolierten Varianten weist die Angabe (3/3) darauf hin, dass die drei zur Sequenzierung abgegebenen Klone eine identische Sequenz zeigten.

Insgesamt wurden bei der Komplementation von  $\Delta trpF$ -Zellen mit einer pTNA-*malE*-*hisAF*-Genbank sieben verschiedene HisAF-Varianten isoliert, wobei in den beiden M9<sup>-</sup>-Flüssigkulturen jeweils eine Variante (HisAF-N54Y+L112P bzw. HisAF-A6V+K143E+T146M+D173V+A197V) angereichert wurde. Die Abbildung 47 zeigt eine Auswahl der mutierten Reste.



**Abbildung 47: Strukturmodell von HisAF mit einer Auswahl von im Komplementationstest auf TrpF-Aktivität identifizierte mutierten Positionen.**

In blau ist die N-terminale Hälfte von HisA, in grün die C-terminale Hälfte von HisF gezeigt. Zur Orientierung sind die in den Ausgangsproteinen essenziellen Reste Asp8 ( $\beta$ -Strang 1) und Asp127 ( $\beta$ -Strang 5) in rot dargestellt. In orange sind die Reste His75 ( $\beta$ -Strang 3), Phe111 ( $\alpha$ -Helix 4), Lys143 (*loop* zwischen  $\beta$ -Strang 5' und  $\beta$ -Strang 5''), Thr146 ( $\beta$ -Strang 5'') und Asp173 (*loop*  $\beta$ 6 $\alpha$ 7) gezeigt. Die Struktur wurde von Martin Ostermeier (Lehrstuhl Biochemie II, Universität Regensburg) durch Homologie-Modellierung mit MODELLER generiert.

Auffällig ist, dass die Position Asp173 in vier der sieben gefundenen Varianten zu einem hydrophoben Rest mutiert ist – dreimal zu einem Valin und einmal zu einem Glycin. In einer Variante wurde nur der Austausch D173V gefunden, d. h., dieser Austausch reicht alleine bereits zur Etablierung von TrpF-Aktivität *in vivo* aus. Der Rest Asp173 in HisAF entspricht Asp176 in HisF, welches Teil der C-terminalen Phosphatbindestelle ist (Lang *et al.*, 2000).

Weiterhin sind die Austausche H75Y, F111L und D127V interessant. Der Rest Asp127 in HisAF entspricht dem Asp130 aus HisF, dessen Austausch gegen Valin zur Etablierung schwacher TrpF-Aktivität auf HisF ausreicht (Leopoldseder *et al.*, 2004). Die Mutationen H75Y und F111S erhöhen die TrpF-Aktivität der HisA-D127V Variante (Jürgens *et al.*, 2000). Die Austausche D108E und L112P liegen in

unmittelbarer Nähe von F111S (F111L in HisAF) und könnten somit einen ähnlichen Effekt haben.

Betrachtet man die Lage der Reste, dann könnten auch die Austausche K143E, T146M und S169C von Bedeutung sein. Die Reste Lys143 und Thr146 liegen im Bereich zwischen  $\beta$ -Strang 5 und  $\alpha$ -Helix 5, also am Katalysepol des Barrels (Abbildung 1) oberhalb des möglichen aktiven Zentrums (Abbildung 47). Der Rest Ser169 (in Abbildung 47 nicht gezeigt) liegt am Ende von  $\beta$ -Strang 6 und somit in räumlicher Nähe zu Asp173.

Unklar ist der mögliche Einfluss der Mutationen N54Y, S59N, V101M und H241R. Außerdem wurde an vier Positionen der konservative Austausch eines Alanins zu einem Valin gefunden. Diesen Austauschen wurde in Hinblick auf eine mögliche Katalyse keine Bedeutung beigemessen.

#### 4.6.2.2 Retransformation der $\Delta trpF$ -Zellen mit den selektierten HisAF-Varianten

Zur Bestätigung der ermittelten Komplementationszeiten und zum direkten Vergleich der Varianten wurden elektrisch kompetente  $\Delta trpF$ -Zellen einzeln mit den sieben gefundenen pTNA-*malE-hisAF*-Varianten aus Tabelle 14 transformiert und auf M9<sub>Amp</sub>-Selektionsmedium ausgestrichen. Als Kontrollen wurden die des Komplementationstests eingesetzt (4.6.2), welche in verschiedenen Sektoren auf einer großen M9<sup>-</sup>-Selektionsplatte in einer 1:100 Verdünnung ausgestrichen wurden. Zusätzlich wurden die beiden Negativkontrollen separat in getrennten Sektoren auf einer großen M9<sup>-</sup>-Selektionsplatte ausgestrichen. Die aus der Genbank isolierten Konstrukte wurden in einer 1:100 und einer 1:1000 Verdünnung auf jeweils einer großen M9<sup>-</sup>-Selektionsplatte ausplattiert. Zur Kontrolle der erfolgreichen Transformation wurden alle Konstrukte zusätzlich auf LB<sub>Amp</sub>-Platten in einer 1:100 Verdünnung ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C.

Die Positivkontrolle lieferte nach 22 h sichtbare Kolonien, während bei den Negativkontrollen während der gesamten Inkubationsdauer von 113 h kein Wachstum zu beobachten war. Nach 42 h konnte bei  $\Delta trpF$ -Zellen mit fünf HisAF-Varianten schwaches Koloniewachstum beobachtet werden. Bei den Varianten HisAF-N54Y+L112P und HisAF-A88V+S169C+A217V konnten dagegen erst nach 97 h Kolonien detektiert werden. Die zu diesem Zeitpunkt beobachteten Größen der Kolonien mit den verschiedenen HisAF-Varianten sind in Tabelle 15 aufgelistet.

**Tabelle 15: Ergebnis der Komplementation nach Retransformation von  $\Delta trpF$ -Zellen mit den selektierten pTNA-*maI*E-*hisAF*-Varianten.**

Koloniegröße	HisAF-Variante	Nr.
Groß	A6V, K143E, T146M, D173V, A197V	<i>seI</i> <sup>a</sup>
	F111L, D127V, D173V, H241R	<i>seII</i>
Mittel	S59N, H75Y, V101M, K143R	<i>seIII</i>
Klein	D173V	<i>seIV</i>
	H75Y, D108E, D173G	<i>seV</i>
	N54Y, L112P	<i>seVI</i> <sup>a</sup>
	A88V, S169C, A217V	<i>seVII</i>

<sup>a</sup>: Diese Varianten waren aus M9-Flüssigmedium isoliert worden. Die Nummern (Nr.) geben die Bezeichnung der Varianten an, wie sie in der folgenden Charakterisierung verwendet wurden: „*seI*-*seVII*“: selektierte HisAF-Varianten Nr. I-VII. Die Koloniegrößen wurden 97 h nach Ausplattierung auf M9-Selektionsplatten abgeschätzt.

Die Ergebnisse der Retransformation zeigen, dass die Varianten HisAF*seI* und HisAF*seII* die *trpF*-Defizienz der *E. coli* Zellen am schnellsten komplementieren können. Dabei ist zu beachten, dass die erstgenannte Variante aus einer Flüssigkultur und die letztgenannte aus der Selektion auf einer Agarplatte gewonnen wurde. In beiden Varianten ist der Austausch D173V enthalten. Dieser findet sich auch in den Varianten, die *E. coli* Zellen nur zu schwachem Wachstum befähigen (HisAF*seIV* und HisAF*seV*). Daraus kann geschlossen werden, dass die zusätzlichen Austausche der Varianten *seI* und *seII* die durch den D173V Austausch bewirkte TrpF-Aktivität unterstützen.

Die deutlich schnellere Komplementation nach Retransformation von  $\Delta trpF$ -Zellen im Vergleich zur Selektion (42 h zu 187 h) beruht vermutlich darauf, dass bei der Retransformation eine viel größere Zellzahl die *trpF*-Defizienz komplementieren kann und sich somit benachbarte Zellen im Wachstum unterstützen. Dieses sog. *cross-feeding* wird durch die Beobachtung unterstützt, dass Zellen mit gleichen Konstrukten bei stärkerer Verdünnung auf der Selektionsplatte, etwas langsamer wachsen.

#### 4.6.3 Expression und Reinigung der selektierten HisAF-Varianten mit TrpF-Aktivität

Um die Ergebnisse der Komplementationsversuche *in vivo* durch *steady-state* enzymkinetische Messungen der TrpF-Aktivität *in vitro* zu ergänzen, wurden die entsprechend der Retransformation am vielversprechendsten erscheinenden HisAF-

Varianten *seII*, II und III in Abwesenheit von MBP charakterisiert. Zusätzlich wurde die HisAF-Variante *seIV* untersucht, um den Effekt des alleinigen Austausches D173V zu ermitteln.

Zunächst wurden die Gene über *SphI* und *BamHI* in das Expressionsplasmid pQE70 (2.2.4) kloniert, wodurch die Genprodukte mit einem C-terminalen (His)<sub>6</sub>-Tag versehen wurden. Bei der anschließenden Expression im analytischen Maßstab in *E. coli* KK8 Zellen (Zellen mit vollständiger Deletion des Tryptophanoperons zur Vermeidung der Kontamination von Aktivitätsmessungen *in vitro* mit *E. coli* TrpF) mit dem Helferplasmid pDMI,1 (2.2.5) wurden die vier HisAF-Varianten nur in geringen Mengen produziert. Da aus früheren Experimenten bekannt war, dass HisAF nur in solchen *E. coli* Zellen exprimiert wird, in denen ein Plasmid für tRNAs mit seltenen Codonen vorliegt (Höcker, 2002), wurden zur präparativen Expression *E. coli* KK8 Zellen mit dem pRARE-Plasmid aus *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS Zellen verwendet (2.1). Die Selektion auf erfolgreiche Transformation der *E. coli* KK8-Rosetta Zellen mit den in pQE70 klonierten *hisAF*-Varianten erfolgte auf LB<sub>Amp/Kana/Chlor</sub>-Platten. Allerdings war auch hier die Ausbeute an löslichen HisAF-Varianten nach Reinigung über Nickel-Chelat-Affinitätschromatografie sehr gering. So konnten z. B. aus einem Liter Kulturmedium lediglich 3,4 mg der Variante HisAF-S59N+H75Y+V101M+K143R gereinigt werden.

Um die Ausbeute weiter zu steigern, wurden die vier HisAF-Varianten mit den in Kapitel 4.2.2 beschriebenen Austauschen Y140H und V231M kombiniert (HisAF*seIII* nur mit Y140H) und über *NdeI* und *NotI* in pET21a kloniert. Dadurch befand sich am C-terminalen Ende der jeweiligen HisAF-Variante wiederum ein (His)<sub>6</sub>-Tag. Die heterologe Genexpression erfolgte in *E. coli* T7 Express Rosetta Zellen.

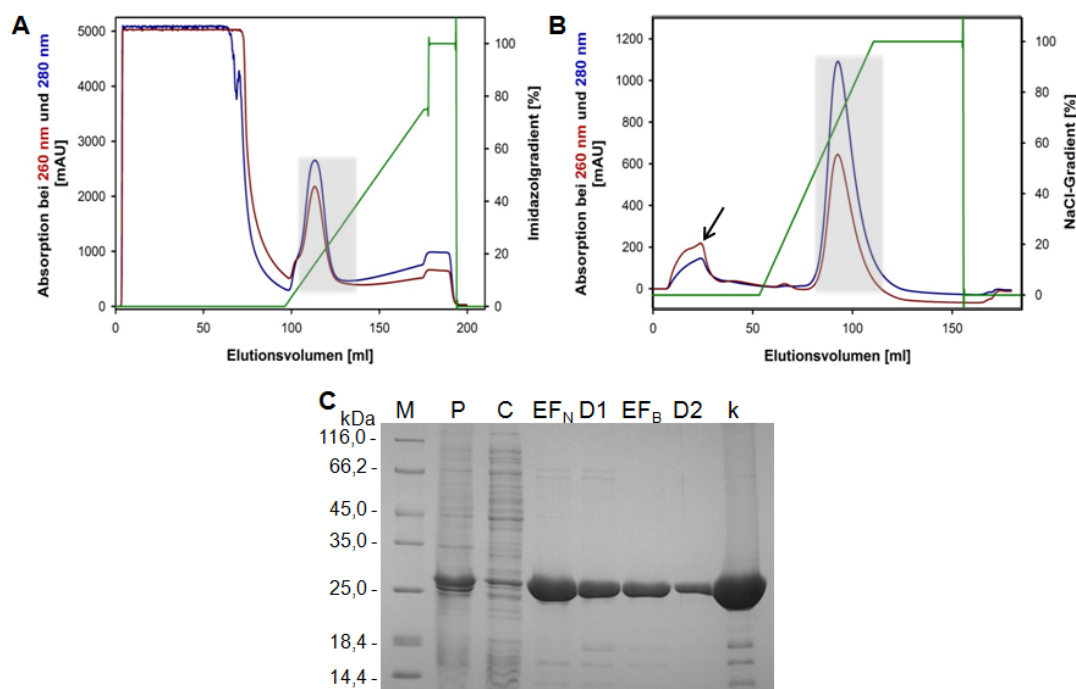
**Tabelle 16:** Selektierte HisAF-Varianten, die gereinigt und auf TrpF-Aktivität *in vitro* untersucht wurden.

Nr.	HisAF-Variante
<i>seI</i> '	Y140H, V231M, K143E, T146M, D173V, A197V
<i>seII</i> '	Y140H, V231M, F111L, D127V, D173V, H241R
<i>seIII</i> '	Y140H, S59N, H75Y, V101M, K143R
<i>seIV</i> '	Y140H, V231M, D173V

Bei HisAF*seII*' wurde der Austausch A6V (Tabelle 14 und Tabelle 15) durch die Verwendung des 5'*hisA*-*NdeI*-Primers wieder entfernt.

Tabelle 16 zeigt, dass HisAFse/III' der Austausch V231M fehlt. Es wurde gezeigt, dass dieser Austausch keinen Einfluss auf die Katalyse hat (4.6.5.1 und 4.6.6.2), die Stabilität der HisAF-Varianten durch diesen Austausch aber negativ beeinflusst wird (4.2.2). Bei der Klonierung von HisAFse/I', II' und IV' lag diese Information noch nicht vor.

Von den HisAF-Varianten wurden stets zwei einzelne Kolonien für eine Expression im analytischen Maßstab in 5 ml LB<sub>Amp/Chlor</sub> bei 37 °C angezogen; die präparative Expression wurde wie in 3.4.1.2 beschrieben durchgeführt. Die Reinigung der rekombinanten Proteine aus dem löslichen Zellextrakt erfolgte über Nickel-Chelat-Affinitätschromatografie (3.4.2.2; Elution der HisAF-Varianten bei ca. 65–195 mM Imidazol) und, wenn nicht anders angegeben, anschließend weiter über Blue Sepharose (3.4.2.3; Elution bei 1,9–3,5 M NaCl). Das Ergebnis ist in Abbildung 48 am Beispiel einer HisAF-Variante dargestellt.



**Abbildung 48: Exemplarische Reinigung eines rekombinanten HisAF-Proteins aus dem löslichen Zellextrakt.**

**A:** Elutionsprofil der Reinigung über Nickel-Chelat-Affinitätschromatografie, aufgenommen über die Messung der Absorption bei 260 nm (rot) bzw. 280 nm (blau). Die Elution erfolgte über einen Gradienten von 15–400 mM Imidazol (grün).

**B:** Elutionsprofil der Reinigung über Blue Sepharose Affinitätschromatografie, aufgenommen über die Messung der Absorption bei 260 nm (rot) bzw. 280 nm (blau). Die Elution erfolgte über einen NaCl-Gradienten von 0–3,5 M NaCl (grün). Der Pfeil deutet auf den zusätzlichen Reinigungseffekt durch die Blue Sepharose Säule hin, durch deren Verwendung noch vorhandene Nukleinsäuren aus der Präparation entfernt werden konnten.

**C:** SDS-PAGE (12,5 % Polyacrylamid) der verschiedenen Anreicherungsschritte. M: Markerproteine mit molekularer Masse in kDa; P: unlösliche Zellfraktion; C: lösliche Zellfraktion; EF<sub>N</sub>: Hauptelutionsfraktion der Reinigung über Nickel-Chelat-Affinitätschromatografie; D1: Probe nach

Dialyse der 1. Reinigung; EF<sub>B</sub>: Hauptelutionsfraktion der Reinigung über Blue Sepharose Affinitätschromatografie; D2: Probe nach Dialyse der 2. Reinigung; k: Konzentrat von D2.

Die grau hinterlegten Bereiche in den Chromatogrammen deuten auf die vereinigten Fraktionen hin. Exemplarisch ist hier die Reinigung der Variante HisAFcomI gezeigt (4.6.6.1).

Die bei der Reinigung der HisAF-Varianten erzielten Ausbeuten sind in Tabelle 40 im Anhang zusammengestellt.

#### 4.6.4 *In vitro* Charakterisierung der selektierten HisAF-Varianten mit TrpF-Aktivität

##### 4.6.4.1 *Steady-state* enzymkinetische Messungen der TrpF-Aktivität der gereinigten HisAF-Varianten

Die TrpF-Aktivität, also der Umsatz von PRA zu CdRP, der selektierten HisAF-Varianten wurde durch einen fluorimetrischen Test (Hommel *et al.*, 1995) *in vitro* gemessen. Um sicherzustellen, dass die in die Varianten eingeführten Austausche Y140H und V231M (Tabelle 16) nicht zur Etablierung von TrpF-Aktivität auf HisAF beitragen, wurde exprimiertes und gereinigtes HisAF-Y140H+V231M Protein in einer Konzentration von 56 µM mit 100 µM PRA versetzt. Es wurde kein Substratumsatz beobachtet, d. h. HisAF-Y140H+V231M zeigt keine messbare TrpF-Aktivität (Daten nicht gezeigt). Die HisAFseII' bis seIV' zeigten dagegen wie erwartet TrpF-Aktivität *in vitro*. In Tabelle 17 sind die aus den PRA-Sättigungskurven (Daten nicht gezeigt) abgeleiteten *steady-state* kinetischen Parameter aufgelistet.

**Tabelle 17: *Steady-state* enzymkinetische Parameter der TrpF-Aktivität der selektierten HisAF-Varianten.**

Nr.	HisAF-Variante	$k_{\text{cat}}$ [min <sup>-1</sup> ]	$K_M^{\text{PRA}}$ [µM]	$k_{\text{cat}}/K_M^{\text{PRA}}$ [min <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ]
seII'	K143E, T146M, D173V, A197V	0,081	67	1,2
seIII'	F111L, D127V, D173V, H241R	0,57	84 <sup>a</sup>	6,8
seIII'	S59N, H75Y, V101M, K143R	0,019	205 <sup>a</sup>	0,1
seIV'	D173V	0,017	53	0,3
<b>Referenzen</b>				
	HisA-D127V <sup>(1)</sup>	0,52	74	7,0
	HisF-D130V <sup>(1)</sup>	0,011	74	0,15

HisAFseII', II' und IV' enthalten zusätzlich Y140H und V231M, HisAFseIII' enthält zusätzlich Y140H.  
 $k_{\text{cat}}$ : Wechselzahl;  $K_M^{\text{PRA}}$ : Michaelis-Menten-Konstante;  $k_{\text{cat}}/K_M^{\text{PRA}}$ : katalytischer Effizienzparameter

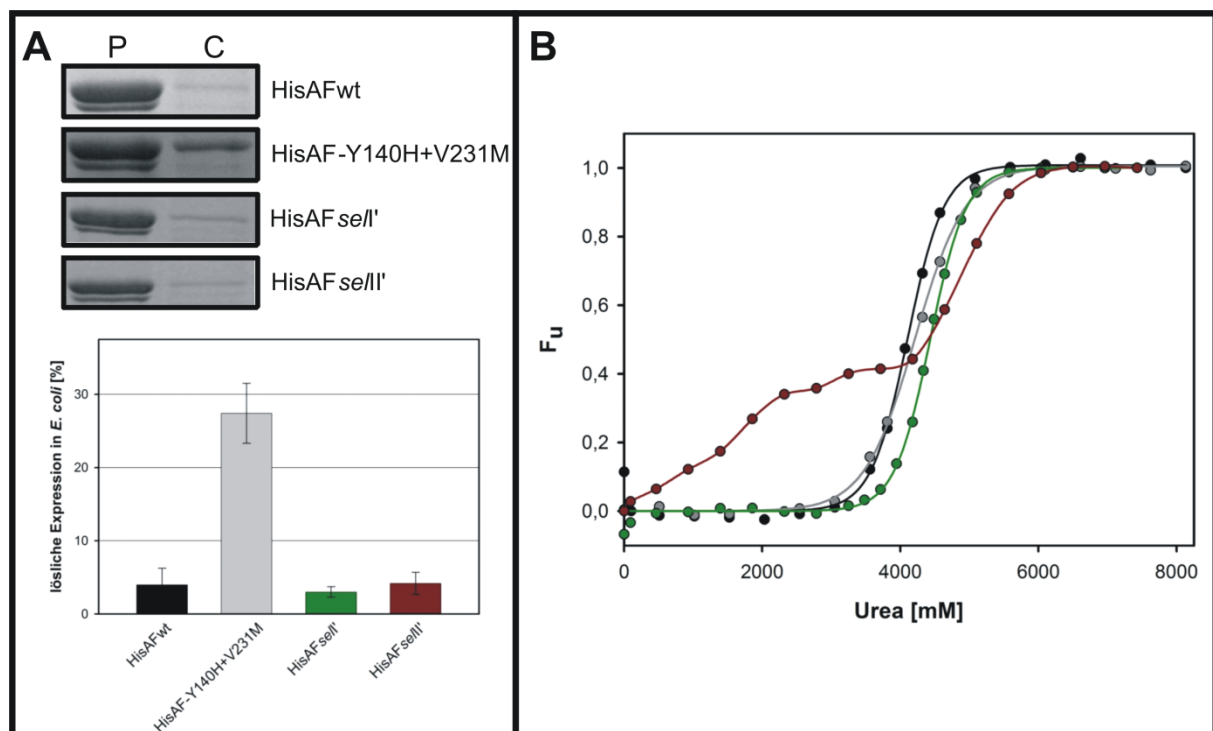


Die Reaktion erfolgte in 50 mM HEPES, pH 7,5,  $E_4$ ,  $D_2$ , 4 mM  $MgCl_2$  bei 25 °C. Es wurden 12,5 bis 275  $\mu M$  PRA durch die jeweilige Variante (*seI'*: 27,9  $\mu M$ ; *seII'*: 8,4  $\mu M$ ; *seIII'*: 44,1  $\mu M$ ; *seIV'*: 55,8  $\mu M$ ) in 50 mM HEPES, pH 7,5,  $E_4$ ,  $D_2$ , 4 mM  $MgCl_2$  bei 25 °C umgesetzt. In jedem Ansatz befand sich ein 30-facher molarer Überschuss an PRPP über AA sowie 1  $\mu M$  yPRT und 2,5  $\mu M$  tmTrpC.

<sup>a</sup>: apparenter  $K_M$ -Wert (bei HisAF*seII'* sind >0,9 mM  $P_i$  und bei HisAF*seIII'* sind >0,8 mM  $P_i$  in den jeweiligen Reaktionsansätzen enthalten); <sup>(1)</sup>: Daten aus Leopoldseder *et al.* (2004).

Die in Tabelle 17 aufgelisteten katalytischen Parameter der vier charakterisierten HisAF-Varianten zeigen, dass die Varianten HisAF*seIII'* und *seIV'* vergleichbar schwach aktiv sind wie HisF-D130V. Lediglich der  $K_M^{PRA}$ -Wert von Variante *seIII'* ist aufgrund des als kompetitiver Inhibitor wirkenden Restphosphates im Reaktionsansatz deutlich erhöht (siehe unten).

Der Vergleich der deutlich aktiveren Varianten HisAF*seI'* und *seII'* zeigt, dass der  $k_{cat}$ -Wert von Variante *seII'* um den Faktor 7 höher liegt als für Variante *seI'* und somit im Bereich von HisA-D127V. Aus Kapitel 4.6.2.1 ist bekannt, dass die Variante *seI'* aus der Selektion im M9<sup>-</sup>-Flüssigselektionsmedium stammt, während die Variante *seII'* auf M9<sup>-</sup>-Agarplatten gewachsen ist. Aus diesem Grund sollten die beiden Varianten *seI'* und *seII'* genauer untersucht werden. Dazu wurde die Löslichkeit beider Proteine in *E. coli* und die konformationelle Stabilität in Harnstoff bestimmt (Abbildung 49).



**Abbildung 49: Vergleich der Löslichkeiten (A) und der konformationellen Stabilität (B) von HisAF-*seI'* HisAF-*seII'* im Vergleich zu HisAF-Y140H+V231M und HisAFwt.**

**A oben:** Unlösliche (P) und lösliche (C) Fraktionen von *E. coli* T7 Express Rosetta Zellen mit den rekombinanten Proteinen (SDS-Gel; 12,5 % Polyacrylamid; gefärbt mit Commassie-blau).

**A unten:** Prozentanteil der löslich hergestellten Proteine, jeweils als Mittelwert aus der Analyse von drei verschiedenen Klonen. Proteinbanden aus einer SDS-Gel Analyse der Proteine wurden fotografiert und ihre Intensitäten mittels OptiQuant bestimmt (3.5.2.2).

**B:** Auffaltung der Proteine in Harnstoff. Die Messungen wurden in 50 mM KP, pH 7,5 bei 25 °C durchgeführt. Die Proben einer Messreihe enthielten 4,5 bis 5,5 µM Protein. Das fluorimetrische Signal wurde über 15 s aufgenommen und gemittelt. Die Anregung erfolgte bei 280 nm und die Emission wurde bei 317 nm verfolgt. Die durchgezogenen Linien sollen das Auge führen. Die Farbcodierung entspricht der aus (A).

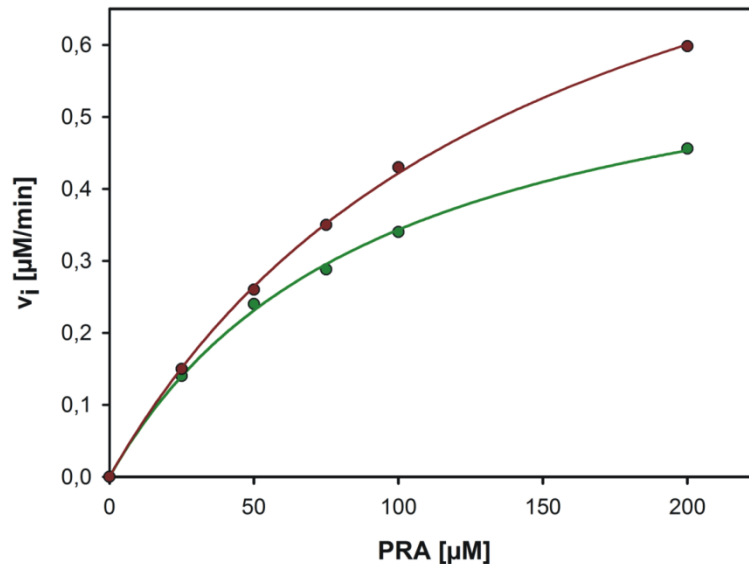
Der Vergleich der beiden HisAF-Varianten mit der höchsten TrpF-Aktivität zeigt, dass ihre Aminosäureaustausche die Löslichkeit vergleichbar stark herabsetzen (Abbildung 49A). In Hinblick auf die konformationelle Stabilität verhalten sich beide Varianten hingegen sehr unterschiedlich (Abbildung 49B). HisAFse/II', welche auf einer Agarplatte selektiert wurde, zeigt eine deutliche Beeinträchtigung der Stabilität und faltet unkooperativ auf. Demgegenüber zeigt die im Flüssigmedium selektierte Variante HisAFse/II', durch die zusätzlichen Austausche eine Stabilisierung im Vergleich zu HisAF und HisAF-Y140H+V231M. Die geringe Stabilität von HisAFse/II' erklärt, warum diese bei Umpufferung in 50 mM HEPES, pH 7,5 sofort ausfällt und nur in Gegenwart von Phosphat in den TrpF-Aktivitätstest eingesetzt werden konnte. Gleiches gilt für HisAFse/III' (Tabelle 17).

#### 4.6.5 Charakterisierung von HisAF-Varianten nach gezielter Mutagenese

##### 4.6.5.1 HisAF-Y140H+D127V und HisAF-Y140H+D8N+D127V

Sowohl in HisA als auch in HisF reichte eine Substitution aus, um auf dem jeweiligen Gerüst TrpF-Aktivität zu etablieren (Leopoldseder *et al.*, 2004). Dabei handelt es sich um den Austausch des jeweils am C-terminalen Ende des  $\beta$ -Strangs 5 gelegenen essenziellen Rests Asp127 (HisA) bzw. Asp130 (HisF) gegen Valin bzw. einen nicht-negativ geladenen Rest. Um zu untersuchen, ob in analoger Weise zu HisA-D127V und HisF-D130V die TrpF-Aktivität auf HisAF etablierbar ist, wurde HisAF-Y140H+D127V hergestellt. Durch die zusätzliche Herstellung von HisAF-Y140H+V231M+D127V sollte überprüft werden, ob der Austausch V231M die Katalyse der TrpF-Reaktion negativ beeinflusst. Dazu wurden die Varianten *hisAF*-Y140H+D127V und *hisAF*-Y140H+V231M+D127V über die Megaprimermethode (3.3.7.1) mit Hilfe des 3'*hisF*-D130V Primers, endständigen Genprimern und den Templaten pET21a-*hisAF*-Y140H bzw. pET21a-*hisAF*-Y140H+V231M amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *Nde*I und *Not*I in pET21a kloniert. Die Expression und Reinigung erfolgte wie in Kapitel 4.6.3 beschrieben. Die

enzymkinetische Charakterisierung entsprach der Beschreibung in Kapitel 3.5.6.2. In Abbildung 50 sind die PRA-Sättigungskurven von HisAF-Y140H+D127V und HisAF-Y140H+V231M+D127V gezeigt.



**Abbildung 50: PRA-Sättigungskurven zur Quantifizierung der TrpF-Aktivitäten von HisAF-Y140H+D127V (grün) und HisAF-Y140H+V231M+D127V (rot).**

Es wurden 25 bis 200  $\mu\text{M}$  PRA durch 50  $\mu\text{M}$  der jeweiligen Variante in 50 mM HEPES, pH 7,5,  $E_4$ ,  $D_2$ , 4 mM  $\text{MgCl}_2$  bei 25 °C umgesetzt. In jedem Ansatz befand sich ein 30-facher molarer Überschuss an PRPP über AA sowie 1  $\mu\text{M}$  yPRT und 2,5  $\mu\text{M}$  tmTrpC.

Aufgetragen ist jeweils die Anfangsgeschwindigkeit  $v_i$  gegen die Konzentration des Substrates PRA. Die durchgezogene Linie zeigt das Ergebnis des Computerfits (Programm Sigma Plot) der Daten mit einer hyperbolischen Funktion.

In Tabelle 18 sind die aus den Sättigungskurven abgeleiteten katalytischen Parameter zusammen mit denen von HisA-D127V und HisF-D130V aufgelistet.

**Tabelle 18: Steady-state enzymkinetische Parameter der TrpF-Aktivität von HisAF-Y140H und HisAF-Y140H+V231M+D127V.**

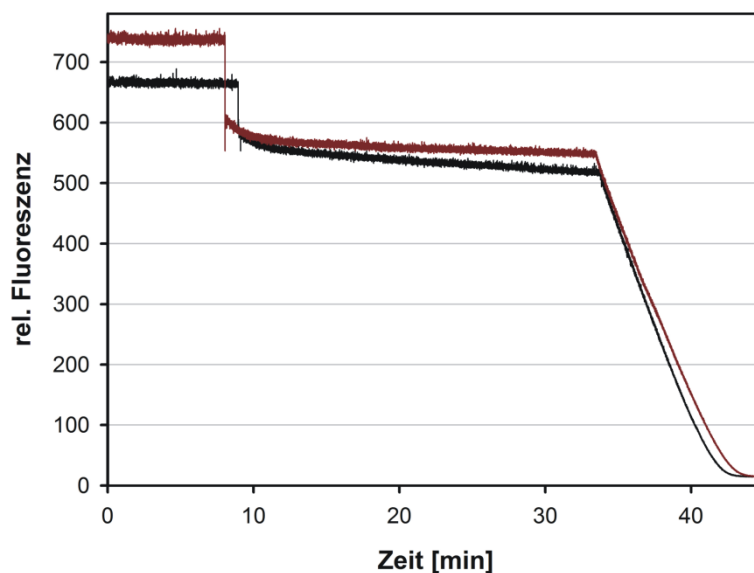
HisAF-Variante	$k_{\text{cat}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$K_M^{\text{PRA}}$ [ $\mu\text{M}$ ]	$k_{\text{cat}}/K_M^{\text{PRA}}$ [ $\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ]
Y140H+D127V	0,013	94 <sup>a</sup>	0,14
Y140H+V231M+D127V	0,021	147 <sup>a</sup>	0,14
<b>Referenzen</b>			
HisA-D127V <sup>(1)</sup>	0,52	74	7,0
HisF-D130V <sup>(1)</sup>	0,011	74	0,15

Für jede Variante sind die durch den Computerfit der Sättigungskurve ermittelten Werte aufgelistet.  $k_{\text{cat}}$ : Wechselzahl;  $K_M^{\text{PRA}}$ : Michaelis-Menten-Konstante;  $k_{\text{cat}}/K_M^{\text{PRA}}$ : katalytischer Effizienzparameter. Die Reaktion erfolgte in 50 mM HEPES, pH 7,5,  $E_4$ ,  $D_2$ , 4 mM  $\text{MgCl}_2$  bei 25 °C.

<sup>a</sup>: apparenter  $K_M$ -Wert (bei HisAF-Y140H+D127V sind >0,8 mM  $P_i$  und bei HisAF-Y140H+V231M+D127V sind >0,6 mM  $P_i$  enthalten); <sup>(1)</sup>: Daten aus Leopoldseder *et al.* (2004).

Tabelle 18 zeigt, dass in HisAF der Austausch D127V zu einer vergleichbaren Aktivität führt wie der analoge Austausch in HisF und diese Aktivität durch den zusätzlichen Austausch V231M nicht bzw. nur leicht beeinflusst wird.

Es konnte gezeigt werden, dass in HisA der Rest Asp8 und in HisF der Rest Asp11, die sich jeweils am C-terminalen Ende von  $\beta$ -Strang 1 befinden, essenziell für die TrpF-Aktivität von HisA-D127V und HisF-D130V sind: Sowohl HisA-D8N+D127V als auch HisF-D8N+D130V waren katalytisch inaktiv (Leopoldseder *et al.*, 2004). Um zu untersuchen, ob in analoger Weise die TrpF-Aktivität von HisAF-Y140H+D127V an die Anwesenheit von Asp8 am C-terminalen Ende von  $\beta$ -Strang 1 gebunden ist, wurde in der vorliegenden Arbeit die Variante HisAF-Y140H+D8N+D127V hergestellt, indem eine PCR mit den Primern 5'*hisA*-D8N und 3'*hisF*-NotI und dem Templat pET21-*hisAF*-Y140H+D127V durchgeführt wurde. Die Klonierung erfolgte über *NdeI* und *NotI* in pET21a und die Expression und Reinigung erfolgte wie in Kapitel 4.6.3 beschrieben. Wie Abbildung 51 zeigt, führt der zusätzliche Austausch D8N in HisAF-Y140H+D127V zwar zu einer Beeinträchtigung, nicht aber zum vollständigen Verlust der TrpF-Aktivität.



**Abbildung 51: TrpF-Aktivität *in vitro* der gereinigten HisAF-Y140H+D8N+D127V-Variante (rot) im Vergleich zu HisAF-Y140H+D127V (schwarz), gemessen als Umsatzkurve unter Fließgleichgewichtsbedingungen.**

Es wurden 200  $\mu$ M PRA durch 50  $\mu$ M Enzym (Zugabe nach ca. 8 min) umgesetzt. Nach Anregung bei 350 nm wurde die Reaktion fluorimetrisch bei 400 nm und 25 °C verfolgt (Hommel *et al.*, 1995). In einem Gesamtvolumen von 1 ml 50 mM HEPES, pH 7,5,  $E_4$ ,  $D_2$ , 4 mM  $MgCl_2$  befanden sich 200  $\mu$ M AA, 6 mM PRPP, 1  $\mu$ M yPRT und 2,5  $\mu$ M TrpC.

Gestartet wurde die Messung durch Zugabe der HisAF-Variante nach Erreichen einer konstanten Fluoreszenzintensität. Nach ca. 32 min wurde das verbliebene PRA durch Zugabe von tmTrpF vollständig umgesetzt.

Für HisAF-Y140H+D8N+D127V wurde aus der Steigung zwischen der 16. und 30. Minute eine Anfangsgeschwindigkeit von 0,27  $\mu\text{M}/\text{min}$  berechnet. Für eine analoge Messung mit 100  $\mu\text{M}$  PRA konnte eine Anfangsgeschwindigkeit von 0,24  $\mu\text{M}/\text{min}$  ermittelt werden (Daten nicht gezeigt), d. h., man kann bei 200  $\mu\text{M}$  PRA von Substratsättigung ausgehen und die gemessene Umsatzrate von 0,27  $\mu\text{M}/\text{min}$  mit  $V_{\text{max}}$  gleichsetzen. Daraus lässt sich bei einer Enzymkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  ein  $k_{\text{cat}}$ -Wert im Bereich von 0,005-0,006  $\text{min}^{-1}$  ableiten, was einer Verschlechterung um einen Faktor 2–3 im Vergleich zu HisAF-Y140H+D127V entspricht. Bezogen auf den  $k_{\text{cat}}$ -Wert befindet man sich mit HisAF-Y140H+D8N+D127V im Bereich von HisF-D130P ( $k_{\text{cat}}$ : 0,0055  $\text{min}^{-1}$ ; Leopoldseder *et al.*, 2004). Es wurde spekuliert, dass Asp8 bzw. Asp11 die TrpF-Aktivität von HisA-D127V bzw. HisF-D130V als allgemeine Base unterstützen (Leopoldseder *et al.*, 2004). Ohne weitere Information ist gegenwärtig keine Aussage darüber möglich, welcher anderer Rest diese Aufgabe in HisAF-Y140H+D127V übernehmen könnte.

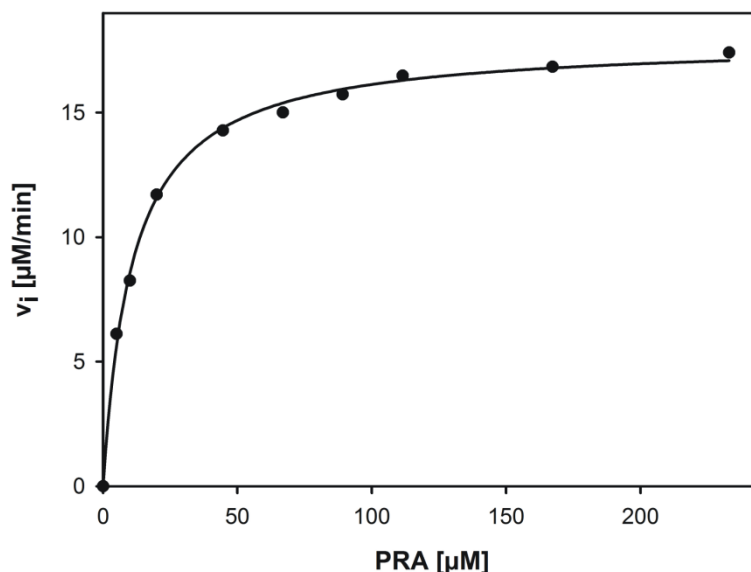
#### 4.6.6 Gezielte Kombination von gefundenen Austauschen

Aus den in Tabelle 17 aufgelisteten HisAF-Varianten wurden verschiedene Austausche gezielt miteinander kombiniert. Insgesamt wurden dabei drei neue HisAF-Varianten generiert (HisAFcomI, comII und comIII), wobei sukzessiv Austausche hinzugenommen wurden. Die Austauschkombinationen sind in der Überschrift des jeweiligen Kapitels und in den zusammenfassenden Tabellen aufgeführt.

##### 4.6.6.1 HisAFcomI (HisAF-Y140H+D127V+D173V)

Die in der Selektion isolierte HisAFseII'-Variante enthielt neben den beiden Austauschen D127V und D173V, die jeweils bereits alleine zur Etablierung schwacher TrpF-Aktivität führen (Tabelle 17 und Tabelle 18), zusätzlich die Austausche F111L und H241R (Tabelle 15). Während von F111L vermutet werden konnte, dass dieser Austausch die TrpF-Aktivität begünstigt (Jürgens *et al.*, 2000), war über eine mögliche Funktion von H241R nichts bekannt. Um weitere Informationen zu erhalten, wurde eine HisAF-Variante hergestellt, in der nur die beiden Reste D127V und D173V miteinander kombiniert sind.

Die Klonierung von *hisAFcoml* erfolgte durch OE-PCR (3.3.7.2) auf dem Templat pET21a-*hisAF-Y140+ D8N+D127V* mit den Mutagenisierungsprimern 5'- und 3'*hisF-D176V* und den endständigen Genprimern 5'*hisA-NdeI* und 3'*hisF-NotI* in pET21a. Die Expression und Reinigung erfolgte wie in Kapitel 4.6.3 dargestellt. Die enzymkinetische Charakterisierung entsprach der Beschreibung in Kapitel 3.5.6.2. Das Ergebnis ist Abbildung 52 zu entnehmen.



**Abbildung 52: PRA-Sättigungskurve zur Quantifizierung der TrpF-Aktivität von HisAFcoml.**

Es wurden 5 bis 233 µM PRA durch jeweils 10 µM HisAFcoml in 50 mM HEPES, pH 7,5, E<sub>4</sub>, D<sub>2</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub> bei 25 °C umgesetzt. In jedem Ansatz befand sich ein 30-facher molarer Überschuss an PRPP über AA sowie 2 µM yPRT und 2,5 µM tmTrpC.

Aufgetragen ist jeweils die Anfangsgeschwindigkeit  $v_i$  gegen die Konzentration des Substrates PRA. Die durchgezogene Linie zeigt das Ergebnis des Computerfits (Programm Sigma Plot) der Daten mit einer hyperbolischen Funktion.

Die aus der Sättigungskurve abgeleiteten katalytischen Parameter sind in Tabelle 19 aufgelistet.

**Tabelle 19: Steady-state enzymkinetische Parameter der TrpF-Aktivität von HisAFcoml.**

HisAF-Variante	$k_{\text{cat}}$ [min <sup>-1</sup> ]	$K_M^{\text{PRA}}$ [µM]	$k_{\text{cat}}/K_M^{\text{PRA}}$ [min <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ]
<i>coml</i> (Y140H+D127V+D173V)	1,9 ± 0,1	18,5 ± 7,0	112,1 ± 45,7
<b>Referenzen</b>			
HisAF-Y140H+D127V	0,013	94 <sup>a</sup>	0,14
HisAF-Y140H+D173V	0,017	53	0,3
HisA-D127V <sup>(1)</sup>	0,52	74	7,0
HisA-D127V+D169A <sup>(2)</sup>	1,7	21	81

$k_{\text{cat}}$ : Wechselzahl;  $K_M^{\text{PRA}}$ : Michaelis-Menten-Konstante;  $k_{\text{cat}}/K_M^{\text{PRA}}$ : katalytischer Effizienzparameter.

Für HisAFcomI sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Sättigungskurven angegeben. Die Reaktion erfolgte in 50 mM HEPES, pH 7,5, E<sub>4</sub>, D<sub>2</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub> bei 25 °C. <sup>a</sup>: apparenter K<sub>M</sub>-Wert (>0,8 mM P<sub>i</sub>); <sup>(1)</sup>: Daten aus Leopoldseder *et al.*, 2004; <sup>(2)</sup>: Daten aus Dumm, 2006

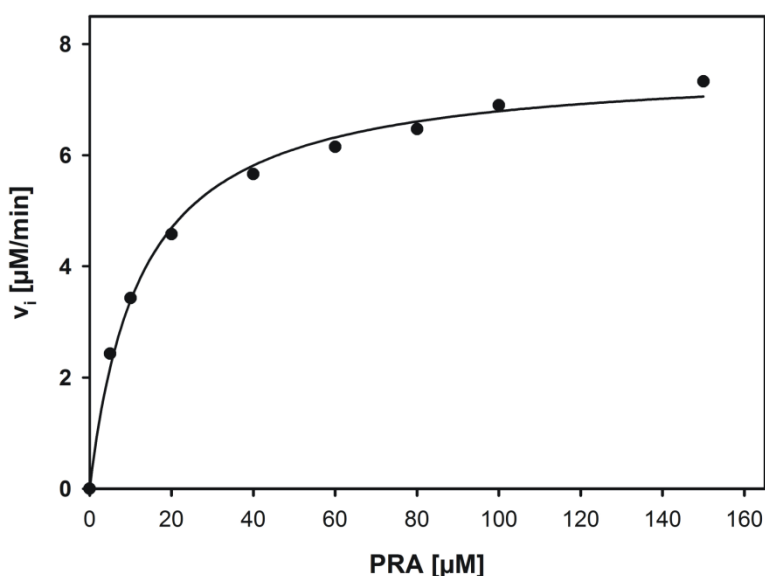
Ein analoger Ansatz wurde bereits früher für HisA verfolgt (Dumm, 2006). Hier wurde HisA-D127V+D169A hergestellt und charakterisiert (Asp169 entspricht Asp176 in HisF bzw. Asp173 in HisAF). In HisA-D127V verbesserte sich sowohl der  $k_{cat}$ - als auch der K<sub>M</sub><sup>PRA</sup>-Wert durch den zusätzlichen Austausch D169A um den Faktor 3–4 (Tabelle 19). Interessanterweise konnte jedoch für die Einzelmutante HisA-D169A keine TrpF-Aktivität nachgewiesen werden (Dumm, 2006). Tabelle 19 zeigt, dass die TrpF-Aktivitäten von HisAFcomI und HisA-D127V+D169A nahezu identisch sind und deutlich höher liegen als das Produkt der Aktivitäten der jeweiligen Einzelmutanten. Der  $k_{cat}$ -Wert von HisAFcomI liegt um mindestens einen Faktor 100 höher als der der Einzelmutanten und die katalytische Effizienz verbessert sich sogar um einen Faktor 370–800. Somit kann sowohl für HisA-D127V+D169A, als auch für HisAFcomI ein synergistischer Effekt der beiden Mutationen beobachtet werden, der, bezogen auf die katalytische Effizienz, bei der Chimäre deutlich stärker ausfällt (Tabelle 19). Eine mögliche Erklärung für die Synergie der beiden Reste D127V und D173V könnte sein, dass sich die negative Ladung des jeweils anderen Rests in den Einzelmutanten negativ auf die Bindung und den Umsatz des negativ geladenen Substrates PRA auswirkt. Erst wenn beide negativ geladenen Reste im aktiven Zentrum von HisAF durch Valine ersetzt werden, würde eine relativ effiziente Katalyse möglich.

#### 4.6.6.2 HisAFcomII (Y140H+H75Y+F111L+D127V+D173V)

Aus Jürgens *et al.* (2000) war bekannt, dass die beiden Reste H75Y und F111S die durch D127V etablierte TrpF-Aktivität auf HisA verbessern. Interessanterweise wurden Mutationen an diesen beiden Positionen bei der Selektion auf TrpF-Aktivität auf HisAF erneut gefunden (Tabelle 15). In HisAFseII befand sich der Austausch F111L und in HisAFseIII mit H75Y der identische Austausch zur HisA-Selektion. Aus diesem Grund sollte überprüft werden, ob die TrpF-Aktivität von HisAFcomI durch die zusätzlichen Austausche H75Y und F111L weiter verbessert wird.

Die Klonierung von *hisAFcomII* erfolgte durch die Megaprimermethode (3.3.7.1) auf dem Templat pET21a-*hisAFseII* mit dem endständigen Genprimer 5'*hisA*-NdeI und dem Mutagenisierungsprimer 3'*hisA*-H75Y. Der in HisAFseII vorliegende Austausch

H241R wurde durch eine zweite Megaprimer-PCR entfernt, indem ein 3'Megaprimer durch die Primer 5'*hisF*-D176V und 3'*hisF*-NotI auf dem Templat pET24a-*hisAF* amplifiziert wurde und dieser zur Entfernung von H241R verwendet wurde. Über *NdeI* und *NotI* wurde das resultierende Konstrukt *hisAFcomII* in pET21a kloniert. Die Expression und Reinigung wurde wie in Kapitel 4.6.3 beschrieben durchgeführt. Die enzymkinetische Charakterisierung entsprach der Beschreibung in Kapitel 3.5.6.2. Das Ergebnis zeigt Abbildung 53.



**Abbildung 53: PRA-Sättigungskurve zur Quantifizierung der TrpF-Aktivität von HisAFcomII.**

Es wurden 5 bis 150 µM PRA durch jeweils 2,5 µM von HisAFcomII in 50 mM HEPES, pH 7,5, E<sub>4</sub>, D<sub>2</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub> bei 25 °C umgesetzt. In jedem Ansatz befand sich ein 30-facher molarer Überschuss an PRPP über AA sowie 1 µM yPRT und 2,5 µM tmTrpC.

Aufgetragen ist jeweils die Anfangsgeschwindigkeit  $v_i$  gegen die Konzentration des Substrates PRA. Die durchgezogene Linie zeigt das Ergebnis des Computerfits (Programm Sigma Plot) der Daten mit einer hyperbolischen Funktion.

In Tabelle 20 sind die aus der Sättigungskurve von HisAFcomII abgeleiteten Parameter aufgelistet.

**Tabelle 20: Steady-state enzymkinetische Parameter der TrpF-Aktivität von HisAFcomII.**

HisAF-Variante	$k_{cat}$ [min <sup>-1</sup> ]	$K_M^{PRA}$ [µM]	$k_{cat}/K_M^{PRA}$ [min <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ]
comII (Y140H+H75Y+F111L+D127V+D173V)	2,5 ± 1,0	13,9 <sup>a</sup> ± 3,3	181,3 ± 61,8

$k_{cat}$ : Wechselzahl;  $K_M^{PRA}$ : Michaelis-Menten-Konstante;  $k_{cat}/K_M^{PRA}$ : katalytischer Effizienzparameter. Angegeben ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Sättigungskurven. Die Reaktion erfolgte in 50 mM HEPES, pH 7,5, E<sub>4</sub>, D<sub>2</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub> bei 25 °C.

<sup>a</sup>: apparenter  $K_M^{PRA}$ -Wert (es waren >0,09 mM P<sub>i</sub> im Reaktionsansatz enthalten)



Der Vergleich von Tabelle 20 mit Tabelle 19 zeigt, dass der  $k_{\text{cat}}$ -Wert durch die beiden zusätzlichen Austausche H75Y und F111L leicht von  $1,8 \text{ min}^{-1}$  für HisAFcomI auf  $2,5 \text{ min}^{-1}$  verbessert wurde. Obwohl die HisAFcomII-Variante nur unter inhibitorischen Bedingungen vermessen werden konnte, da die quantitative Entfernung von Orthophosphat aus Stabilitätsgründen nicht möglich war, liegt der apparente  $K_{\text{M}}^{\text{PRA}}$  von  $13,9 \mu\text{M}$  im Bereich des  $K_{\text{M}}^{\text{PRA}}$ -Wertes für HisAFcomI (Tabelle 19). Es ist anzunehmen, dass der  $K_{\text{M}}^{\text{PRA}}$ -Wert von HisAFcomII mit den zusätzlichen Austauschen H75Y und F111L unter nicht-inhibitorischen Bedingungen möglicherweise niedriger liegen würde. Da die Variante HisAFcomII beim Umpuffern in 50 mM HEPES, pH 7,5 sofort ausfiel, konnte diese Vermutung nicht geklärt werden.

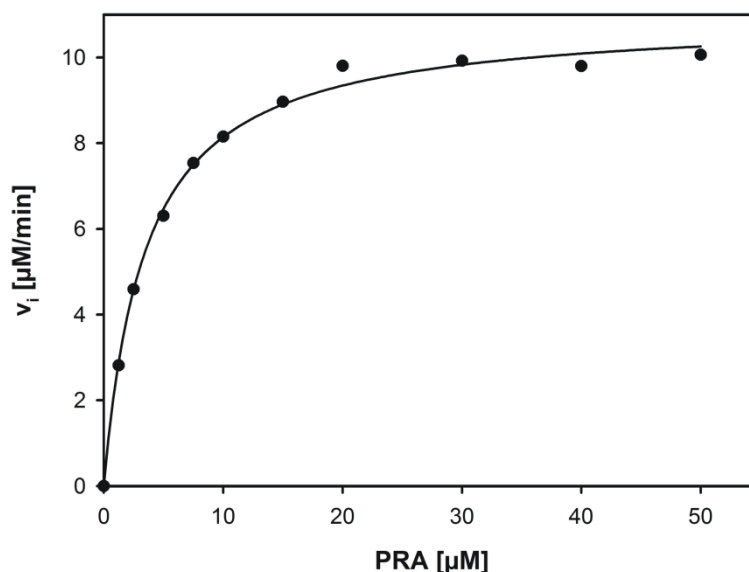
Die Variante HisAFcomII lag zunächst mit dem zusätzlichen Austausch V231M kloniert vor. Die Charakterisierung dieser Variante lieferte identische katalytische Parameter wie die in Tabelle 20 aufgeführten Werte der Variante ohne V231M.

#### 4.6.6.3 HisAFcomIII (Y140H+H75Y+F111L+D127V+K143E+T146M+D173V)

Wie Tabelle 17 zu entnehmen ist, liegt die katalytische Effizienz der im Flüssigmedium selektierten Variante HisAFseII' um einen Faktor 4 höher als die der Variante HisAFseIV'. Dies ist auf einen höheren  $k_{\text{cat}}$ -Wert zurückzuführen. Es wurde vermutet, dass diese Verbesserung auf die zusätzlichen Austausche K143E und T146M zurückgeht, da sich diese im Bereich zwischen  $\beta$ -Strang 5 und  $\alpha$ -Helix 5 – also oberhalb des aktiven Zentrums – befinden (Abbildung 47). Zusätzlich lässt sich Tabelle 17 entnehmen, dass sich die Varianten HisAFseII' und seIV', anders als HisAFseIII' und seIII', vor der enzymkinetischen Charakterisierung in 50 mM HEPES, pH 7,5 umpuffern ließen, da ihre  $K_{\text{M}}$ -Werte in Abwesenheit von Phosphat bestimmt werden konnten. Abgeleitet aus den beschriebenen Beobachtungen wurde die Variante HisAFcomII um die beiden Austausche K143E und T146M ergänzt (HisAFcomIII), wodurch eine Erhöhung des  $k_{\text{cat}}$ -Wertes und der konformationellen Stabilität erreicht werden sollte.

Die Klonierung von *hisAFcomIII* erfolgte durch OE-PCR (3.3.7.2) auf dem Templat pET21a-*hisAFcomII* mit den Mutagenisierungsprimern 5'- und 3'-*hisF*-Y143H+K146E+T149M und den endständigen Genprimern 5'-*hisA*-NdeI und 3'-*hisF*-NotI in pET21a. Expression und Reinigung von HisAFcomIII erfolgte wie bereits

beschrieben (4.6.3). Die enzymkinetische Charakterisierung entsprach der Beschreibung in Kapitel 3.5.6.2. Das Ergebnis ist in Abbildung 54 dargestellt.



**Abbildung 54: PRA-Sättigungskurve zur Quantifizierung der TrpF-Aktivität von HisAFcomIII.**

Es wurden 1,25 bis 50 µM PRA durch jeweils 3,1 µM HisAFcomIII in 50 mM HEPES, pH 7,5, E<sub>4</sub>, D<sub>2</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub> bei 25 °C umgesetzt. In jedem Ansatz befand sich ein 30-facher molarer Überschuss an PRPP über AA sowie 0,5 µM yPRT und 1,25 µM tmTrpC.

Aufgetragen ist jeweils die Anfangsgeschwindigkeit  $v_i$  gegen die Konzentration des Substrates PRA. Die durchgezogene Linie zeigt das Ergebnis des Computerfits (Programm Sigma Plot) der Daten mit einer hyperbolischen Funktion.

Die aus der Sättigungskurve abgeleiteten katalytischen Parameter sind in Tabelle 21 zusammengestellt.

**Tabelle 21: Steady-state enzymkinetische Parameter der TrpF-Aktivität von HisAFcomIII im Vergleich zu ausgewählten Referenzproteinen.**

HisAF-Variante	$k_{\text{cat}}$ [min <sup>-1</sup> ]	$K_M^{\text{PRA}}$ [µM]	$k_{\text{cat}}/K_M^{\text{PRA}}$ [min <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ]
comIII (Y140H+H75Y+F111L+D127V+K143E+T146M+D173V)	4,0 ± 0,4	2,9 ± 0,5	1425 ± 377
<b>Referenzen</b>			
ecTrpF <sup>(1)</sup>	2070	12,2	1,7·10 <sup>5</sup>
scPriA <sup>(2)</sup>	720	4	1,8·10 <sup>5</sup>
tmTrpF <sup>(1)</sup>	222	0,28	7,9·10 <sup>5</sup>

$k_{\text{cat}}$ : Wechselzahl;  $K_M^{\text{PRA}}$ : Michaelis-Menten-Konstante;  $k_{\text{cat}}/K_M^{\text{PRA}}$ : katalytischer Effizienzparameter. Angegeben ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängig aufgenommenen Sättigungskurven. Die Reaktion erfolgte in 50 mM HEPES, pH 7,5, E<sub>4</sub>, D<sub>2</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub> bei 25 °C. <sup>(1)</sup>: Daten aus Sterner et al. (1996); <sup>(2)</sup>: Daten aus Kuper et al. (2005).

Der Vergleich von Tabelle 21 mit Tabelle 20 zeigt, dass beide Ziele – eine Verbesserung des  $k_{\text{cat}}$ -Wertes und ein Stabilitätsgewinn in 50mM HEPES, pH 7,5 –

durch die Austausche K143E und T146M erreicht wurden. Der  $k_{\text{cat}}$ -Wert verbessert sich leicht um den Faktor 1,6 von  $2,5 \text{ min}^{-1}$  auf  $4,0 \text{ min}^{-1}$ . Somit erzielen die beiden Austausche in diesem Kontext jedoch nicht den beim Vergleich der HisAF-Varianten *sell'* und *se/IV'* beobachteten Faktor von 4,8 (Tabelle 17), wo sich der  $k_{\text{cat}}$ -Wert von  $0,017 \text{ min}^{-1}$  auf  $0,081 \text{ min}^{-1}$  verbessert hat.

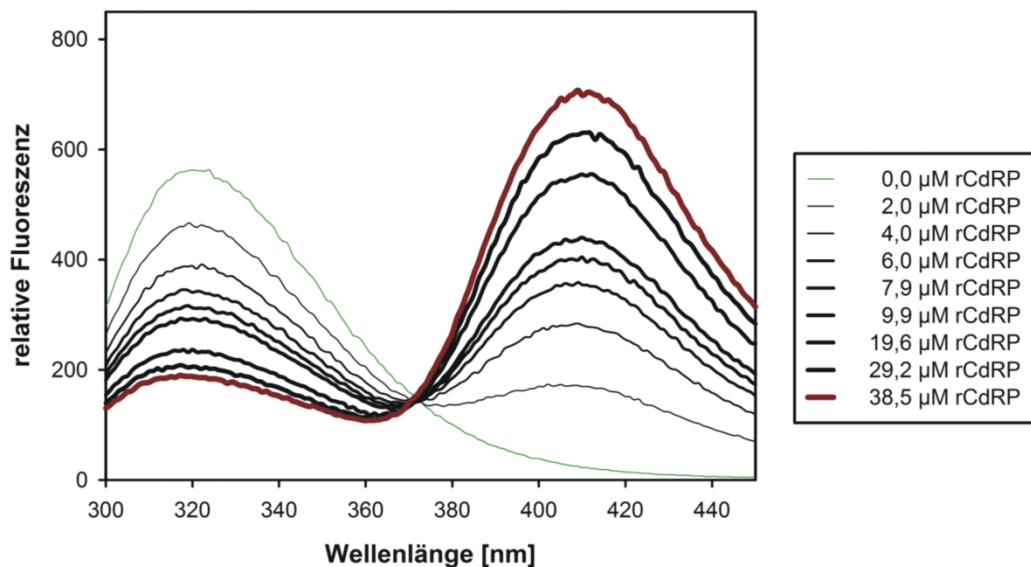
Durch die zusätzlichen Austausche K143E und T146M gewinnt die HisAF-Variante an Stabilität und kann in 50 mM HEPES, pH 7,5 umgepuffert werden, sodass keine kompetitive Inhibition durch Phosphat beachtet werden muss. Danach verbessert sich in HisAF*comIII* der  $K_{\text{M}}^{\text{PRA}}$ -Wert auf  $2,9 \mu\text{M}$  im Vergleich zum apparenten  $K_{\text{M}}^{\text{PRA}}$ -Wert von  $13,9 \mu\text{M}$  für HisAF*comII*. Da sich keine weiteren Kombinationen von Austauschen aus den selektierten HisAF-Varianten anboten, wurde dieser nicht weiter geführt. Insgesamt ist das Vorgehen als sehr erfolgreich anzusehen, da die katalytische Effizienz von HisAF*comIII* um 3–4 Größenordnungen über der von HisAF*sell'*–IV' liegt (Tabelle 17 und Tabelle 21). Vergleicht man den katalytischen Effizienzparameter  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{PRA}}$  von HisAF*comIII* mit den Referenzproteinen, fällt auf, dass dieser nur noch zwei Größenordnungen unter dem der wildtypischen Proteine *ecTrpF*, *scPriA* und *tmTrpF* liegt (Tabelle 21). Maßgeblich dafür ist der im Bereich der wildtypischen Proteine liegende  $K_{\text{M}}^{\text{PRA}}$ -Wert. Hingegen liegt der  $k_{\text{cat}}$ -Wert von HisAF*comIII* noch etwa um einen Faktor 50 unterhalb des  $k_{\text{cat}}$ -Wertes von *tmTrpF*.

#### 4.6.6.4 Ligandenbindung an HisAF*comII* und HisAF*comIII*

##### 4.6.6.4.1 Bindung von rCdRP an HisAF*comIII*

Der niedrige  $K_{\text{M}}^{\text{PRA}}$ -Wert von HisAF*comIII* von  $2,9 \mu\text{M}$  (Tabelle 21) deutete darauf hin, dass diese Variante das TrpF-Substrat und somit vermutlich auch das Produkt CdRP mit hoher Affinität bindet. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde HisAF*comIII* mit dem stabilen TrpF-Produktanalogon reduziertes CdRP (rCdRP) titriert und die Bindung mittels Fluoreszenzenergietransfer (FRET) beobachtet (Hommel *et al.*, 1995; Sterner *et al.*, 1996). Dabei wurde die Tryptophanfluoreszenz des Proteins bei 280 nm angeregt und die Fluoreszenzemission zwischen 300 und 450 nm verfolgt. Es zeigte sich, dass mit zunehmender Konzentration an rCdRP die Proteinfluoreszenz (Maximum bei ca. 320 nm) abnahm, während die des Liganden (Maximum bei ca. 410 nm) zunahm (Abbildung 55). Der isoemissive Punkt bei

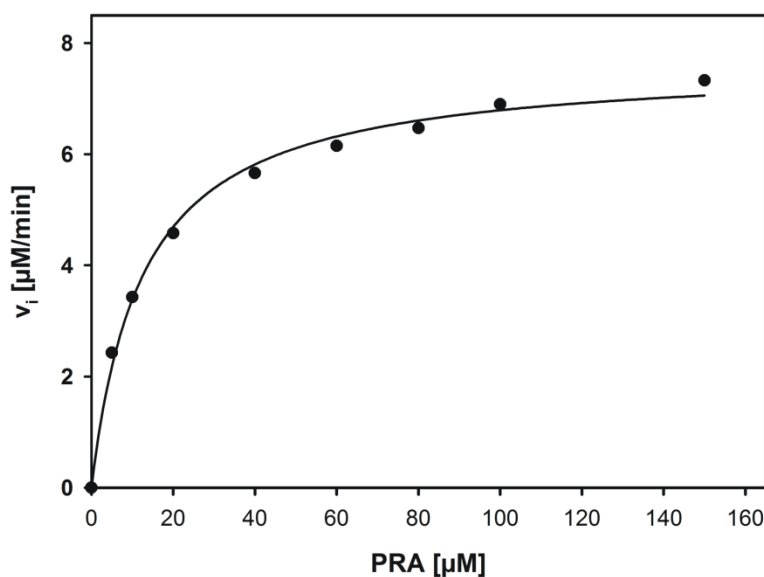
370 nm deutet darauf hin, dass es an HisAFcomIII nur eine einzige Bindestelle für rCdRP gibt.



**Abbildung 55: FRET-Titration von HisAFcomIII mit rCdRP.**

Die Fluoreszenzemissionsspektren wurden nach Anregung bei 280 nm in 50 mM HEPES, pH 7,5 bei 25 °C aufgenommen. Es wurden 5 µM HisAFcomIII eingesetzt und schrittweise die angegebenen Konzentrationen an rCdRP zutitriert.

Zur Quantifizierung der Bindungsstärke wurden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten bei 340 nm über eine Minute gemittelt und nach Abzug des Nullwertes (Enzym in Puffer) gegen die rCdRP-Konzentration aufgetragen. Durch einen Fit der resultierenden hyperbolischen Bindungskurve (Programm Sigma Plot 8.0) wurde die thermodynamische Dissoziationskonstante  $K_d^{\text{rCdRP}} = 5,6 \mu\text{M}$  bestimmt (Abbildung 56).



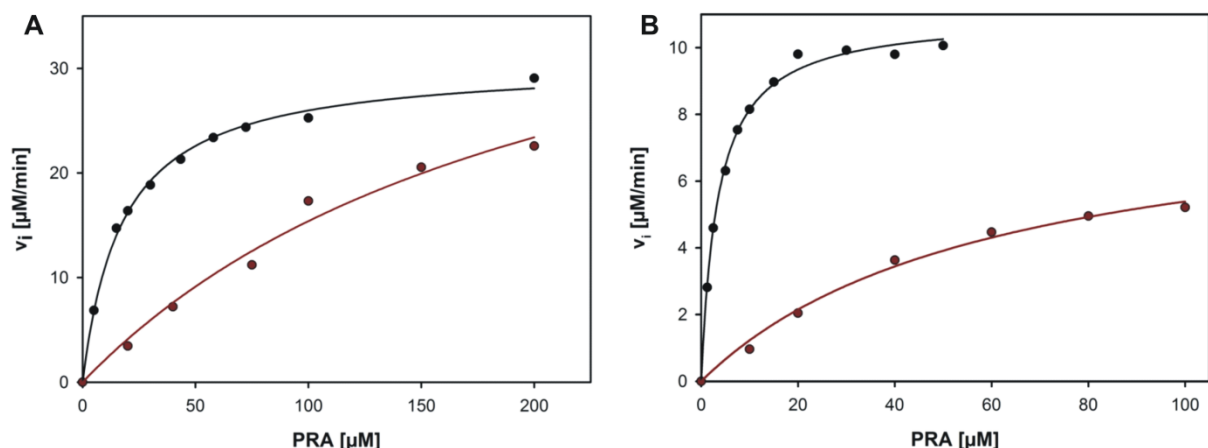
**Abbildung 56: Bindung von rCdRP an HisAFcomIII.**

Die Fluoreszenzemission von 5  $\mu\text{M}$  HisAFcomIII bei 340 nm wurde nach Anregung bei 280 nm in 50 mM HEPES, pH 7,5 bei 25 °C über 1 min gemittelt. Die Abnahme der Fluoreszenz wurde gegen die rCdRP-Konzentration aufgetragen. Die Messpunkte wurden normiert und durch einen Fit mit einer hyperbolischen Funktion (Programm Sigma Plot 8.0) wurde die thermodynamische Dissoziationskonstante  $K_d^{\text{rCdRP}}$  zu 5,6  $\mu\text{M}$  bestimmt.

HisAFcomIII bindet rCdRP somit mit vergleichbar hoher Affinität wie wildtypisches TrpF aus *E. coli*, dessen  $K_d^{\text{rCdRP}}$ -Wert bei 6,8  $\mu\text{M}$  liegt (Hommel *et al.*, 1995).

#### 4.6.6.4.2 Kompetitive Inhibition der TrpF-Reaktion von HisAFcomII und HisAFcomIII durch ProFAR

Weder HisAFwt (Höcker, 2002) noch im Rahmen dieser Arbeit durch Randomisierung erzeugte HisAF-Varianten zeigen nachweisbare HisA- oder HisF-Aktivität (4.7.1). Auch konnte die Bindung des HisA Substrates bzw. des HisF Substratanalogons ProFAR an HisAFwt nicht nachgewiesen werden (Höcker, 2002). Durch die hohe TrpF-Aktivität von HisAFcomII und HisAFcomIII ergab sich über die Messung der kompetitiven Inhibition eine einfache Möglichkeit zum Nachweis der ProFAR-Bindung an diese Varianten. Dazu wurden PRA-Sättigungskurven in An- und Abwesenheit von 100  $\mu\text{M}$  ProFAR (HisAFcomII) bzw. 50  $\mu\text{M}$  ProFAR (HisAFcomIII) aufgenommen. Die Ergebnisse sind Abbildung 57 zu entnehmen.



**Abbildung 57: PRA-Sättigungskurven der TrpF-Aktivität von HisAFcomII (A) und HisAFcomIII (B) zur Quantifizierung der kompetitiven Inhibition durch ProFAR.**

**A:** Es wurden 5 bis 200  $\mu\text{M}$  PRA durch jeweils 10  $\mu\text{M}$  HisAFcomII in 50 mM HEPES, pH 7,5,  $E_4$ ,  $D_2$ , 4 mM  $\text{MgCl}_2$  bei 25 °C ohne ProFAR (●) bzw. in Anwesenheit von 100  $\mu\text{M}$  ProFAR (●) umgesetzt. In jedem Ansatz befand sich ein 30-facher molarer Überschuss an PRPP über AA sowie 1  $\mu\text{M}$  yPRT und 2,5  $\mu\text{M}$  tmTrpC.

**B:** Es wurden 1,25 bis 100  $\mu\text{M}$  PRA durch jeweils 3,1  $\mu\text{M}$  HisAFcomIII in 50 mM HEPES, pH 7,5,  $E_4$ ,  $D_2$ , 4 mM  $\text{MgCl}_2$  bei 25 °C ohne ProFAR (●) bzw. in Anwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  ProFAR (●) umgesetzt. In jedem Ansatz befand sich ein 30-facher molarer Überschuss an PRPP über AA sowie 1  $\mu\text{M}$  yPRT und 2,5  $\mu\text{M}$  tmTrpC.

Aufgetragen ist jeweils die Anfangsgeschwindigkeit  $v_i$  gegen die Konzentration des Substrates PRA. Die durchgezogene Linie zeigt das Ergebnis des Computerfits (Programm Sigma Plot) der Daten mit einer hyperbolischen Funktion.

Aus den Sättigungskurven in Abbildung 57 wurden die in Tabelle 22 aufgelisteten katalytischen Parameter von HisAFcomII und HisAFcomIII in An- und Abwesenheit von ProFAR abgeleitet.

**Tabelle 22: Steady-state enzymkinetische Parameter der TrpF-Aktivität von HisAFcomII und HisAFcomIII in An- und Abwesenheit von ProFAR.**

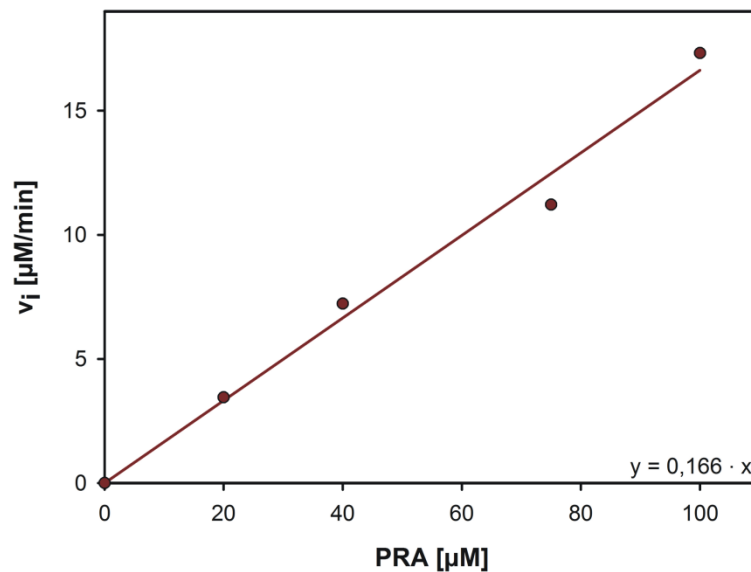
HisAF-Variante	$V_{\max}$ [ $\mu\text{M}/\text{min}$ ]	$k_{\text{cat}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$K_M^{\text{PRA}}$ [ $\mu\text{M}$ ]	$k_{\text{cat}}/K_M^{\text{PRA}}$ [ $\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ]
comII	$30,1 \pm 0,4$	3,1	$17,7^a \pm 1$	175
comII + 100 $\mu\text{M}$ ProFAR	$48,8 \pm 7,8$	4,9	$217^a \pm 53$	22,6
comIII	$11,0 \pm 0,1$	3,5	$3,5 \pm 0,2$	1000
comIII + 50 $\mu\text{M}$ ProFAR	$8,7 \pm 0,8$	2,8	$60,5 \pm 10,9$	57,8

$k_{\text{cat}}$ : Wechselzahl;  $K_M^{\text{PRA}}$ : Michaelis-Menten-Konstante;  $k_{\text{cat}}/K_M^{\text{PRA}}$ : katalytischer Effizienzparameter. Die Reaktion erfolgte in 50 mM HEPES, pH 7,5,  $E_4$ ,  $D_2$ , 4 mM  $\text{MgCl}_2$  bei 25 °C. Angegebene Fehler geben den Unsicherheitsbereich des Computerfits der Sättigungskurve an.

<sup>a</sup>: apparenter  $K_M$ -Wert (es waren jeweils  $>0,15$  mM  $P_i$  in den Reaktionsansätzen enthalten)

Wie bei einer kompetitiven Hemmung erwartet, zeigen Abbildung 57 und Tabelle 22, dass der  $K_M^{\text{PRA}}$ -Wert deutlich zunimmt, während  $V_{\max}$  etwa konstant bleibt. Über den Zusammenhang  $K_M^{\text{app}} = K_M (1 + [I]/K_i)$ , wobei  $K_M^{\text{app}}$  und  $K_M$  die in An- und Abwesenheit des Inhibitors I ermittelten Michaelis-Menten-Konstanten für PRA sind, wurde die Bindungskonstante für ProFAR ( $K_i^{\text{ProFAR}}$ ) bestimmt. Für HisAFcomII ergab sich  $K_i^{\text{ProFAR}}$  zu 8,8  $\mu\text{M}$ , für HisAFcomIII zu 3,1  $\mu\text{M}$ . Das bedeutet, dass ProFAR mit hoher Affinität an HisAFcomII und HisAFcomIII bindet.

Bei den Daten der Messungen mit HisAFcomII in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  ProFAR ist zu berücksichtigen, dass die höchste gemessene Substratkonzentration (200  $\mu\text{M}$ ) unterhalb des bestimmten  $K_M^{\text{PRA}}$ -Wertes (217  $\mu\text{M}$ ) liegt. Dies drückt sich in einer vergleichbar hohen Standardabweichung für diese Messung aus. Zur Validierung dieses Ergebnisses wurde der katalytische Effizienzparameter  $k_{\text{cat}}/K_M^{\text{PRA}}$  aus dem linearen Anfangsteil der Sättigungskurve ermittelt (Abbildung 58).



**Abbildung 58:** Linearer Teil der PRA-Sättigungskurve ( $[S] \ll K_M^{\text{PRA}}$ ) von HisAFcomII in Gegenwart von 100 µM ProFAR.

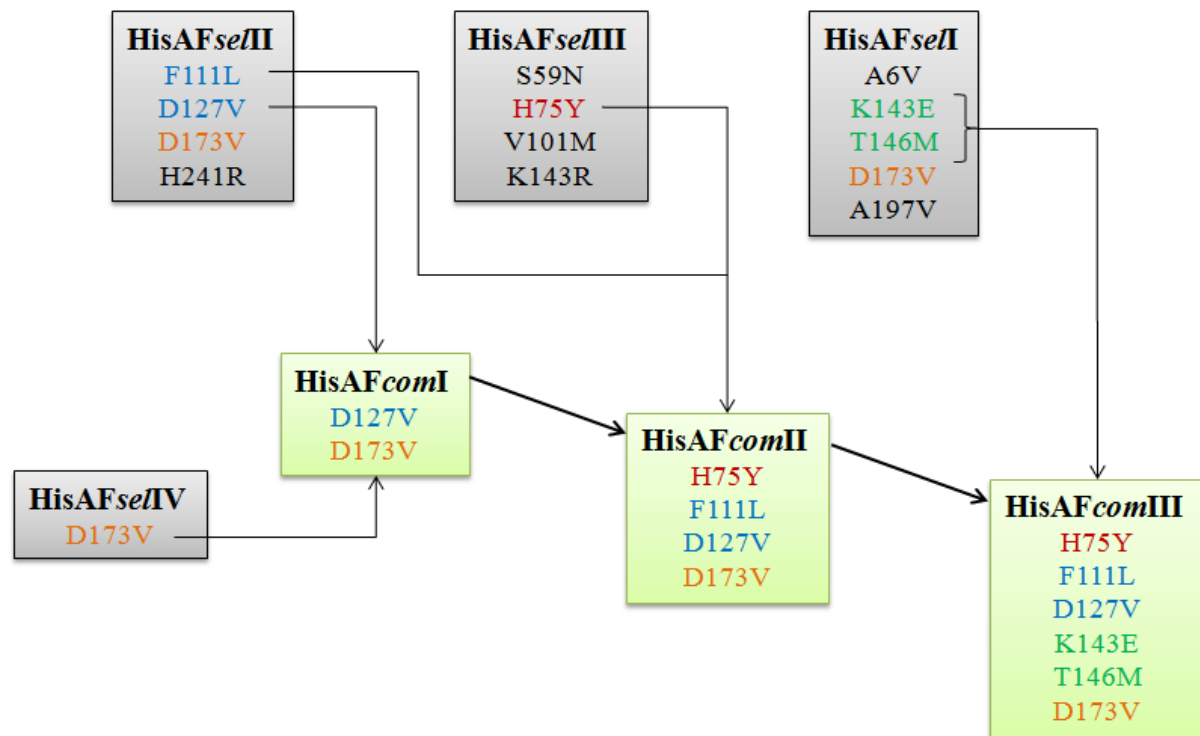
Reaktionsbedingungen: siehe Legende zu Abbildung 57

Die Steigung der Gerade aus Abbildung 58 liefert einen  $k_{\text{cat}}/K_M^{\text{PRA}}$ -Wert von  $16,6 \text{ min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$ , was im vergleichbaren Bereich zu dem aus der Analyse der Sättigungskurve ermittelten Wert von  $22,6 \text{ min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$  liegt. Damit kann auch der berechnete  $K_i^{\text{ProFAR}}$ -Wert ( $8,8 \mu\text{M}$ ) für HisAFcomII als zuverlässig erachtet werden.

#### 4.6.6.5 Zusammenfassung der in Kapitel 4.6 gefundenen Ergebnisse

Durch *in vivo* Komplementation von  $\Delta\text{trpF}$ -Zellen konnten aus einer *hisAF*-Genbank, die ca.  $1,1 \cdot 10^6$  unabhängige Klone enthielt, sieben Varianten mit verschiedenen Austauschen isoliert werden (Tabelle 14). Davon wurden die vier Varianten, die nach der Retransformation am aussichtsreichsten erschienen (Tabelle 15), exprimiert, charakterisiert und ihre TrpF-Aktivitäten durch *steady-state* kinetische Messungen *in vitro* quantifiziert (Tabelle 17). Im nächsten Schritt wurden vielversprechende Austausche dieser Varianten sukzessive miteinander kombiniert, wodurch die katalytische Effizienz ( $k_{\text{cat}}/K_M^{\text{PRA}}$ ) um mehrere Größenordnungen gesteigert werden konnte (Tabelle 19 bis Tabelle 21). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die aktivste HisAFcomIII Variante sowohl das TrpF-Produktanalogon rCdRP als auch das HisA-Substrat ProFAR mit hoher Affinität bindet (4.6.6.4.1 und 4.6.6.4.2).

In Abbildung 59 ist das experimentelle Vorgehen nochmals in einem Schema dargestellt.



**Abbildung 59: Schematische Darstellung der Kombination von Austausch aus selektierten HisAF-Varianten mit TrpF-Aktivität.**

Selektierte HisAF-Varianten (HisAFseI-IV) sind grau, die daraus kombinierten Varianten HisAFcomI-III sind grün hinterlegt. Pfeile symbolisieren den Weg der Kombination der ausgewählten Reste.

Informationen über die Lokalisation der kombinierten Reste von HisAFcomIII können Abbildung 47 entnommen werden. In Tabelle 23 sind die experimentell bestimmten Parameter der charakterisierten HisAF-Varianten zusammengefasst.



**Tabelle 23:** Übersicht über die *steady-state* enzymkinetischen Parameter der TrpF-Aktivität und die Ligandenaffinität charakterisierter HisAF-Varianten im Vergleich zu ausgewählten Referenzproteinen.

HisAF-Variante	$k_{\text{cat}}$ [min <sup>-1</sup> ]	$K_M^{\text{PRA}}$ [μM]	$k_{\text{cat}}/K_M^{\text{PRA}}$ [min <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ]	(A) $K_d^{\text{rCdRP}}$ (B) $K_d^{\text{ProFAR}}$ [μM]
<b>Selektierte Varianten</b>				
<i>sell'</i>	0,081	67	1,2	-
<i>seII'</i>	0,57	84 <sup>a</sup>	6,8	-
<i>seIII'</i>	0,019	205 <sup>a</sup>	0,1	-
<i>seIV'</i>	0,017	53	0,3	-
<b>Variante nach gezielter Mutagenese</b>				
Y140H+D127V	0,013	94 <sup>a</sup>	0,14	-
<b>Kombinierte Varianten</b>				
<i>comI</i>	1,9	18,5	112,1	-
<i>comII</i>	2,5	13,9 <sup>a</sup>	181,3	8,8 <sup>(B)</sup>
<i>comIII</i>	4,0	2,9	1425	5,6 <sup>(A)</sup> / 3,1 <sup>(B)</sup>
<b>Referenzen</b>				
HisA-D127V <sup>(1)</sup>	0,52	74	7,0	-
HisF-D130V <sup>(1)</sup>	0,011	74	0,15	-
ecTrpF <sup>(2, 3)</sup>	2070	12,2	1,7·10 <sup>5</sup>	6,8 <sup>(A)</sup>
scPriA <sup>(4)</sup>	720	4	1,8·10 <sup>5</sup>	-
tmTrpF <sup>(2)</sup>	222	0,28	7,9·10 <sup>5</sup>	1,1 <sup>(A)</sup>

$k_{\text{cat}}$ : Wechselzahl;  $K_M^{\text{PRA}}$ : Michaelis-Menten-Konstante;  $k_{\text{cat}}/K_M^{\text{PRA}}$ : katalytischer Effizienzparameter. Die Reaktionen erfolgten in 50 mM HEPES, pH 7,5, E<sub>4</sub>, D<sub>2</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub> bei 25 °C. <sup>a</sup>: Reaktionen wurden in Gegenwart von Orthophosphat aufgenommen – siehe entsprechende Kapitel. <sup>(1)</sup>: Daten aus Leopoldseder et al. (2004); <sup>(2)</sup>: Daten aus Sterner et al. (1996); <sup>(3)</sup>: Daten aus Hommel et al. (1995); <sup>(4)</sup>: Daten aus Kuper et al. (2005).

#### 4.6.7 Versuche zur Steigerung der TrpF-Aktivität einer aktiven HisAF-Variante

Zur weiteren Steigerung der TrpF-Aktivität sollte eine der drei aktivsten HisAF-Varianten einer erneuten Randomisierung unterzogen werden. Dazu wurden *hisAFcomI*, *hisAFcomII* und *hisAFcomIII* in pTNA umklontiert, sodass diese Varianten für einen Komplementationstest im Rahmen eines Vorversuchs zur Verfügung standen. Diese wurden mit der Positivkontrolle pTNA-*trpF* und der Negativkontrolle pTNA zur Transformation von elektrisch kompetenten *E. coli*  $\Delta trpF$ -Zellen verwendet

und in unterschiedlichen Sektoren von großen M9<sup>-</sup>-Selektionsplatten (Ø 14,5 cm) unverdünnt und in 1:100 Verdünnung ausgestrichen. Zusätzlich wurden die drei zu testenden Konstrukte jeweils zusammen auf drei großen M9<sup>-</sup>-Selektionsplatten in den Verdünnungen 1:10, 1:100 und 1:1000 ausgestrichen. Es wurde die doppelte Anzahl an Selektionsplatten ausplattiert, da die Inkubationstemperaturen 37 °C und 25 °C gewählt wurden. Zur Kontrolle der erfolgreichen Transformation wurden alle Konstrukte in einer 1:10 Verdünnung auf LB<sub>Amp</sub>-Platten ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert. Das Ergebnis des Komplementationstests zeigt Tabelle 24.

**Tabelle 24:** Komplementationsdauer von  $\Delta trpF$ -Zellen mit den angegebenen pTNA-hisAFcomI–III Varianten auf M9<sup>-</sup>-Selektionsmedium bei 37 °C und 25 °C.

pTNA-Konstrukt	Zeit bis Koloniewachstum sichtbar wurde [h]	
	37 °C	25 °C
leer	-	-
tmtrpF	19	46
hisAFcomI	39	183
hisAFcomII	22	111
hisAFcomIII	22	89

Offensichtlich steht bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C nur ein sehr kleines Selektionsfenster zur Verfügung, da die beiden aktivsten HisAF-Varianten nur unwesentlich länger als das wildtypische Enzym brauchen, um die *trpF*-Defizienz zu komplementieren. Vergleicht man tmTrpF und die beste HisAF-Variante HisAFcomIII dagegen bei 25 °C, so öffnet sich das Selektionsfenster auf über 40 h (von 46 h auf 89 h). Dies sollte ausreichend sein, um HisAF-Varianten mit einer verbesserten TrpF-Aktivität durch eine weitere Randomisierung von HisAFcomIII zu erhalten.

Zusätzlich stützen die Komplementationstests, bei 25 °C die bei dieser Temperatur gemessenen *in vitro* Daten: Die Komplementationsdauer nimmt mit zunehmender katalytischer Effizienz von HisAFcomI über HisAFcomII zu HisAFcomIII ab (vgl. Tabelle 19 bis Tabelle 21).

#### 4.6.7.1 Erstellung einer Genbank auf der Variante HisAFcomIII

Zur Randomisierung von *hisAFcomIII* wurde die Methode der *epPCR* unter Verwendung einer unausgeglichene dNTP-Konzentration und unter Zugabe von 0,75 mM MnCl<sub>2</sub> gewählt (3.3.7.4). Die PCR wurde mit den genflankierenden Primern 5'pTNA-*SphI* und 3'pTNA-*HindIII* bei der für dieses Primerpaar experimentell ermittelten optimalen Annealing-Temperatur von 53,4 °C, durchgeführt. Als Templat wurden pro *epPCR*-Ansatz 25 ng pTNA-*hisAFcomIII* DNA eingesetzt. Die zur Klonierung verwendete *SphI*-Schnittstelle schließt die Aminosäure Met1 und die erste Base von Leu2 mit ein, wodurch das erste Codon keiner und das zweite Codon nur für die Basenpositionen 2 und 3 einer Randomisierung unterliegt. Die *HindIII*-Schnittstelle endet dagegen mit dem TGA-Stoppcodon, womit das gesamte Gen 3'-seitig der vollständigen Randomisierung unterliegt. Es wurden drei *epPCR*s (3.3.7.4) mit jeweils einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt und die Amplifikationsprodukte über Agarosegelelektrophorese (3.3.3) analysiert und gereinigt (3.3.3.1). Die drei gereinigten PCR-Produkte und 2 µg des Vektors pTNA wurden jeweils 6 h bei 37 °C mit *SphI/HindIII* inkubiert, erneut über ein Agarosegel analysiert, gereinigt und in je 30 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die verdauten und gereinigten Amplifikationsprodukte wurden vereinigt und anschließend in neun identischen Ansätzen mit dem verdauten und gereinigten pTNA Vektor unter Einsatz von je 1 U T4-Ligase (Roche) für 10 h bei 16 °C in einem Volumen von jeweils 20 µl ligiert. Die Ligationsansätze wurden gegen steriles Wasser dialysiert (3.2.5) und aus den anschließend vereinigten Ansätzen wurden je 5 µl zur Transformation von 21 × 100 µl frisch hergestellten elektrokompenten (3.2.4) *E. coli*  $\Delta hisA \Delta hisF$  Zellen verwendet (2.1). Die transformierten Zellen wurden zur Kur mit jeweils 1,5 ml SOC-Medium aus der Elektroporationsküvette gespült und in zweimal 50 ml Falcons vereinigt. Nach der Kur wurden die Zellen abzentrifugiert (EPPENDORF 5810R 4000 rpm, 10 min, 25 °C), in insgesamt 7 ml SOC-Medium aufgenommen und auf 35 großen SOC<sub>Amp</sub>-Platten (Ø 14,5 cm) ausplattiert (pro Platte 200 µl Zellsuspension). Kleine Aliquots wurden in verschiedenen Verdünnungen auf kleinen SOC<sub>Amp</sub>-Platten ausgestrichen. Über die Auszählung der auf diesen Platten gewachsenen Kolonien konnte abgeschätzt werden, dass sich auf den 35 großen SOC<sub>Amp</sub>-Platten etwa  $5,4 \cdot 10^7$  unabhängige Klone befanden. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz der verwendeten Zellen wurden 100 µl der elektrisch kompetenten *E. coli*  $\Delta hisA \Delta hisF$  Zellen mit 100 ng pTNA transformiert. Nach Ausplattierung in verschiedenen

Verdünnungen auf kleinen SOC<sub>Amp</sub>-Platten wurde die Transformationseffizienz auf etwa  $1,1 \cdot 10^{11}$  cfu/ $\mu$ g abgeschätzt. Mit 20 Kolonien der Genbank wurde eine Kolonie-PCR mit den CyRI/CyPstI-Primern durchgeführt, wodurch die Ligationseffizienz auf 65 % bestimmt werden konnte. Zur Überprüfung der Anzahl und Verteilung der Mutationen wurden zehn Klone vollständig sequenziert und mit der Ausgangssequenz der *hisAFcomIII*-Variante verglichen (Tabelle 25). Dabei zeigte sich, dass eine von zehn Sequenzen keine Mutationen enthielt, wonach die Größe der Genbank um weitere 10 % nach unten korrigiert wurde. Somit ergibt sich eine Größe der Genbank für pTNA-*hisAFcomIII* zu  $3,2 \cdot 10^7$  unabhängiger Varianten. Zur Gewinnung der Genbank wurden alle Kolonien der 35 großen SOC<sub>Amp</sub>-Platten mit Hilfe von flüssigem LB-Medium und einem sterilen Spatel abgeschabt. Die so gewonnene Zellmasse wurde abzentrifugiert (EPPENDORF 5810R 4000 rpm, 10 min, 4 °C; insgesamt 17,6 g Zellen) und das Plasmidgemisch im präparativen Maßstab isoliert (vier Maxi-Präparationen, 3.3.1.2).

**Tabelle 25: Anzahl und Verteilung der Nukleotidaustausche bei zehn zufällig ausgewählten Klonen der *hisAFcomIII* Genbank.**

		<i>hisAFcomIII</i> Genbank nach epPCR	
Zahl der Austausche		29 bei 10 Klonen	
Austausche/ <i>hisAFcomIII</i>		2,9	
Ts	AT→GC	9	31 %
	GC→AT	7	24 %
Tv	AT→TA	9	31 %
	AT → CG	2	7 %
	GC → CG	0	0 %
	GC → TA	2	7 %
AT-Austausche		20	69 %
GC-Austausche		9	31 %
AT→GC / GC→AT		2,2	-
Ts/Tv		1,2	-

Ein Klon enthielt zusätzlich eine Deletion. Im Einzelfall wurden 0 bis 5 Basenaustausche pro Sequenz ermittelt. Ts: Transitionen; Tv: Transversionen

Die Auswertung der *hisAFcomIII*-Genbank zeigt eine sehr ausgewogene Mutationsverteilung. Das Verhältnis von Transitionen zu Transversionen ist in etwa ausgeglichen, während AT-Austausche zu GC-Austauschen überwiegen. Dies

entspricht den Erwartungen für diese Mutagenisierungsmethode (Fromant *et al.*, 1995).

Die durchschnittliche Wahrscheinlichkeit liegt bei 75 %, dass ein Basenaustausch den Austausch einer Aminosäure zur Folge hat (4.6.1). Das bedeutet, dass mit den 2,9 Nukleotidaustauschen pro Gen in der *hisAFcomIII*-Genbank im Durchschnitt 2,2 Aminosäureaustausche erzeugt würden.

#### 4.6.7.2 Komplementation von $\Delta trpF$ -Zellen mit der pTNA-*hisAFcomIII*-Genbank

Zur Selektion von *HisAFcomIII*-Varianten, die durch Aminosäureaustausche die *trpF*-Defizienz bei 25 °C schneller komplementieren können als das Ausgangskonstrukt (89 h; Tabelle 24), wurden  $2 \times 100 \mu\text{l}$  kompetenter  $\Delta trpF$ -Zellen durch Elektroporation mit jeweils 100 ng der pTNA-*hisAFcomIII*-Genbank transformiert. Als Positivkontrollen wurden pTNA-*trpF* und pTNA-*hisAFcomIII* und als Negativkontrolle pTNA eingesetzt. Die nach der Kur in 1 % NaCl gewaschenen Zellen wurden auf  $M9^-_{\text{Amp}}$ -Selektionsmedium und zusätzlich auf  $M9^-_{\text{Trp}}$ -Medium (Nichtselektionsbedingungen) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 25 °C.

##### 4.6.7.2.1 Ergebnis der Selektion auf $M9^-_{\text{Amp}}$ -Selektionsplatten und im $M9^-_{\text{Amp}}$ -Selektionsmedium

Bei der Positivkontrolle pTNA-*trpF* konnte nach 37 h bei 25 °C deutliches Koloniewachstum beobachtet werden. Bis zum Ende des Komplementationstests nach 84 h war auf den Platten mit der Negativkontrolle kein Koloniewachstum feststellbar.

Auf den  $M9^-$ -Selektionsplatten mit der pTNA-*hisAFcomIII*-Genbank wurden zwischen der 60. und 70. h des Komplementationstests eine Reihe von Kolonien sichtbar. Die 19 größten dieser Kolonien wurden markiert und von insgesamt 13 Klonen wurde die Sequenz bestimmt.

Parallel zu dem Komplementationstest auf Selektionsplatten bei 25 °C erfolgte die Selektion im  $M9^-_{\text{Amp}}$ -Flüssigselektionsmedium bei 37 °C und 220 rpm. Dazu wurden jeweils 50 ml  $M9^-_{\text{Amp}}$ -Flüssigmedium mit 500  $\mu\text{l}$  einer 1:10 Verdünnung der Negativkontrolle pTNA und der Positivkontrollen pTNA-*trpF* und pTNA-*hisAFcomIII* angeimpft. Mit 500  $\mu\text{l}$  der unverdünnten und 500  $\mu\text{l}$  der 1:10 verdünnten Genbank wurden jeweils 50 ml  $M9^-_{\text{Amp}}$ -Flüssigselektionsmedium angeimpft. Sobald die beiden

Kulturen der Genbank und die der Positivkontrolle pTNA-*hisAFcomIII* die exponentielle Wachstumsphase erreicht hatten, wurde eine frische M9<sup>-</sup>-Flüssigkultur auf OD<sub>600</sub> 0,1 inokuliert (erfolgte insgesamt neunmal). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden zur Gewinnung von Einzelkolonien Aliquots entnommen und in einer geeigneten Verdünnung auf LB<sub>Amp</sub> ausplattiert. Von gewachsenen Klonen wurde mittels Mini-Präparation DNA isoliert und anschließend die DNA-Sequenz des *hisAFcomIII*-Genbereichs vollständig bestimmt (Tabelle 26).

**Tabelle 26:** Ergebnis der Komplementation von  $\Delta trpF$ -Zellen mit der pTNA-*hisAFcomIII*-Genbank.

M9 <sup>-</sup> <sub>Amp</sub> -Agarplatte		M9 <sup>-</sup> <sub>Amp</sub> -Flüssigmedium	
Zeit [h]	HisAFcomIII-Variante	Zeit [h]	HisAFcomIII -Variante
60	V3I+T139A	60	D108E+F138L
60	H48L	60	L2R+R83S
60	F10Y+K144N	108	A197T
70	L2H+F10Y+D86N+V157A	108	L2H+I56V+E233K
70	V3I+N58S	108	A15V+V65I+L85P
70	V3I+V173I (vorher D173V)	379	V3I+I126M
70	V3I	379	I26M+E89K+R130G+L149P
89	kein Austausch	379	L2H+K144N

Es wurden sechs weitere Sequenzen von Klonen analysiert, die von einer M9<sup>-</sup>-Platte gewonnen wurden. Diese konnten allerdings keiner bekannten Sequenz zugeordnet werden. Gleiches gilt für zwei Sequenzen, die aus dem M9<sup>-</sup>-Flüssigmedium gewonnen wurden. Drei sequenzierte Varianten aus dem M9<sup>-</sup><sub>Amp</sub>-Flüssigmedium wurden nicht in die Übersicht aufgenommen, da diese Sequenzen entweder nur stille Mutationen oder konservative Austausche enthielten.

Das Ergebnis dieses Komplementationstests liefert kein eindeutiges Bild. Positiv ist, dass bestimmte Austausche in verschiedenen Kombinationen öfter auftreten, dazu zählen L2H/R, V3I, F10Y und K144N. Der Austausch K144N befindet sich zwischen den bereits ausgetauschten Resten K143E und T146M (Tabelle 14 und Tabelle 21) in dem *loop*  $\beta 5\alpha 5$ . Auch der Austausch F138L liegt in dieser Region, die somit besonders geeignet für Verbesserungen zu sein scheint.

Negativ ist jedoch zu beurteilen, dass es selbst nach 379 h nicht gelungen ist, eine dominierende Sequenz pro Flüssigkultur anzureichern. Die wahrscheinliche Ursache dafür ist, dass mit HisAFcomIII eine TrpF-aktive Variante als Ausgangskonstrukt für die Genbank fungierte, während in Kapitel 4.6.2.1 HisAF, welches keine TrpF-Aktivität besitzt, als Ausgangskonstrukt verwendet wurde.

#### 4.6.7.3 Retransformation der $\Delta trpF$ -Zellen mit den isolierten HisAFcomIII-Varianten

Zur Bestätigung der ermittelten Komplementationszeiten und zum direkten Vergleich der isolierten Varianten wurde eine Retransformation von  $\Delta trpF$ -Zellen durchgeführt. Dazu wurden als Positivkontrollen pTNA-*hisAFcomIII* und pTNA-*trpF* und als Negativkontrolle pTNA verwendet. Es wurden alle 15 gefundenen HisAFcomIII-Varianten (Tabelle 26) für die Retransformation eingesetzt. Alle Konstrukte wurden in einer 1:100 und einer 1:100.000 Verdünnung auf großen M9<sup>-</sup>-Selektionsplatten, die in sechs gleich große Sektoren aufgeteilt waren, ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 25 °C. Das Ergebnis der Retransformation von  $\Delta trpF$ -Zellen mit selektierten HisAFcomIII-Varianten zeigt Tabelle 27.

**Tabelle 27: Ergebnis der Komplementation nach Retransformation von  $\Delta trpF$ -Zellen mit den selektierten pTNA-*hisAFcomIII*-Varianten bei 25 °C (Selektion auf M9<sup>-</sup><sub>Amp</sub>-Selektionsplatte) und 37 °C (Selektion in M9<sup>-</sup><sub>Amp</sub>-Flüssigmedium).**

Quelle P/F	HisAFcomIII-Variante	Nr.
<b>P</b>	<b>H48L</b>	<b>1</b>
<b>F</b>	<b>V3I+I126M</b>	<b>2</b>
P	F10Y+K144N	3
P	V3I	4
<b>F</b>	<b>L2H+K144N</b>	<b>5</b>
P	V3I+T139A	6
<b>P</b>	<b>L2H+F10Y+D86N+V157A</b>	<b>7</b>
P	V3I+N58S	8
F	L2R+R83S	9
P	V3I+V173I (vorher D173V)	10
<b>F</b>	<b>A15V+V65I+L85P</b>	<b>11</b>
F	L2H+I56V+E233K	12
<b>F</b>	<b>D108E+F138L</b>	<b>13</b>
F	I26M+E89K+R130G+L149P	14
F	A197T	15

Die Reihenfolge der gezeigten Varianten wurde nach der Zeit des Erscheinens und der Fähigkeit weiter wachsende Kolonien zu bilden, erstellt. Varianten, die zu einem Block zusammengefasst wurden, zeigen vergleichbares Wachstum. Alle Varianten sind innerhalb von 34-69 h gewachsen und damit deutlich schneller als das Ausgangskonstrukt (84 h). Die gezeigten Varianten #1-#10 sind zeitgleich zur Positivkontrolle pTNA-*trpF* gewachsen. P/F: Klon isoliert von M9<sup>-</sup><sub>Amp</sub>-Platte/Flüssigmedium. Fettgedruckte Varianten wurden exprimiert, gereinigt und enzymkinetisch charakterisiert (4.6.7.4).

Die Tabelle zeigt, dass insbesondere HisAFcomIII-Varianten mit zusätzlichen Austauschen von Leu2, Val3, Phe10 und Lys144 zu einer schnellen Komplementation befähigt sind. Die einzige Ausnahme bildet der Austausch H48L, der nur in einer einzigen schnell wachsenden Variante als Einzelmutation gefunden wurde. Auffällig ist, dass die HisAFcomIII-Varianten 11 und 13, die zu einem relativ frühen Zeitpunkt (Tabelle 26) aus der M9<sup>-</sup><sub>Amp</sub>-Flüssigkultur entnommen wurden, die *trpF*-Defizienz von den betrachteten Varianten mit am schlechtesten komplementieren konnten. Hingegen komplementieren die Varianten 2 und 5, die nach 379 h der Flüssigkultur entnommen wurden, die *trpF*-Defizienz bei der Retransformation zu einem frühen Zeitpunkt. Interessant ist die Variante 10 (HisAFcomIII-V3I+V173I). Die Position Val173 ist aus der ersten Selektionsrunde aus D173V hervorgegangen. In dieser zweiten Selektionsrunde konnte nun V173I beobachtet werden. Bei Isoleucin handelt es sich im Vergleich zu Valin ebenfalls um einen hydrophoben, aber sterisch anspruchsvolleren Rest. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass für Asp173 die gleichen Regeln gelten wie für Asp127 in HisA und Asp130 in HisF, die zur Etablierung von TrpF-Aktivität durch nicht negativ geladene Reste ersetzt werden müssen (Leopoldseder *et al.*, 2004).

#### 4.6.7.4 Expression, Reinigung und *in vitro* Charakterisierung selektierter HisAFcomIII-Varianten

Die in Tabelle 27 fett hervorgehobenen Varianten wurden mit geeignetem 5'Primer (5'*hisA*-NdeI, 5'*hisA*-L2H, 5'*hisA*-L2H+V3I oder 5'*hisA*-V3I) und 3'*hisF*-NotI mittels PCR in pET21a über NdeI/NotI kloniert, in *E. coli* T7 Express Rosetta Zellen heterolog exprimiert, über Nickel-Chelat-Affinitätschromatografie mittels des C-terminalen (His)<sub>6</sub>-Tags gereinigt (4.6.3) und ihre TrpF-Aktivität anschließend enzymkinetisch charakterisiert.

Entgegen den Erwartungen zeigte keine der charakterisierten Varianten eine signifikant verbesserte Umsatzrate. Am schlechtesten verhielt sich die Variante HisAFcomIII-H48L, die nach der Retransformation als eine der beiden besten Varianten einzustufen war. Der Rest His48 ist in allen bekannten HisA Enzymen konserviert (Henn-Sax, 2001) und sein Austausch gegen Alanin führte zu einer etwa 10-fachen Abschwächung der nativen katalytischen Aktivität (Henn-Sax *et al.*, 2002). Durch den Austausch H48L wurde HisAFcomIII nahezu vollständig unlöslich, sodass nur 4,3 mg Protein aus 2 l TB-Kulturmedium gereinigt werden konnten. Zusätzlich



wurde im Proteinspektrum für diese Variante eine deutliche Aggregationstendenz beobachtet. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass der Austausch H48L, der sich im zentralen *Barrel* befindet, eine massive Destabilisierung zur Folge hat. Eine mit 100  $\mu\text{M}$  PRA gemessene Umsatzkurve deutete zusätzlich auf eine stark beeinträchtigte Katalyse hin, sodass auf eine genauere Charakterisierung dieser Variante verzichtet wurde. Die Selektion dieser Variante muss somit als Artefakt betrachtet werden. Die katalytischen Parameter der übrigen gereinigten HisAFcomIII-Varianten wurden über PRA-Sättigungskurven (nicht gezeigt) ermittelt und können Tabelle 28 entnommen werden.

**Tabelle 28: Steady-state enzymkinetische Parameter der TrpF-Aktivität der selektierten HisAFcomIII-Varianten.**

HisAFcomIII-Variante	$k_{\text{cat}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$K_{\text{M}}^{\text{PRA}}$ [ $\mu\text{M}$ ]	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{PRA}}$ [ $\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ]
V3I+I126M	2,7	4,1	659
L2H+K144N	4,0	1,6	2475
L2H+F10Y+D86N+V157A	3,0	6,0	500
A15V+V65I+L85P	2,7	13,3	203
D108E+F138L	4,2	5,1	824
<b>Referenz</b>			
HisAFcomIII (Y140H+H75Y+F111L+D127V+K143E+T146M+D173V)	4,0	2,9	1425

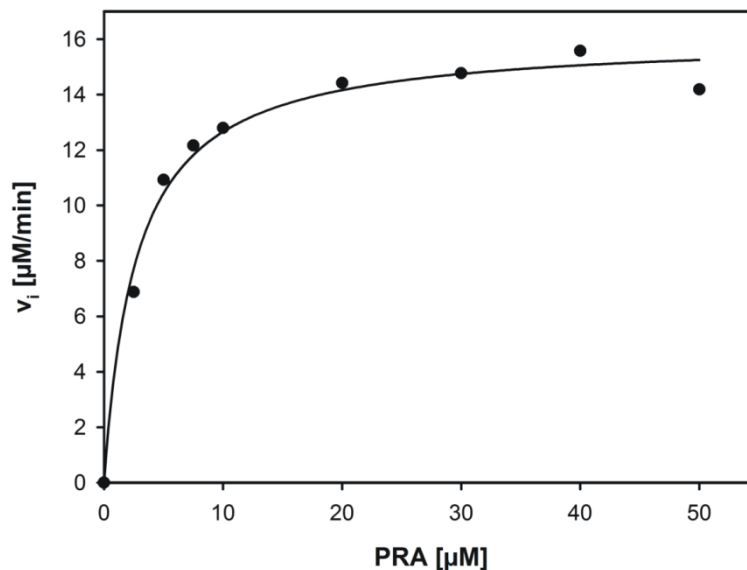
Für jede Variante sind die durch den Computerfit der Sättigungskurve ermittelten Werte aufgelistet.  $k_{\text{cat}}$ : Wechselzahl;  $K_{\text{M}}^{\text{PRA}}$ : Michaelis-Menten-Konstante;  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{PRA}}$ : katalytischer Effizienzparameter. Die Reaktion erfolgte in 50 mM HEPES, pH 7,5,  $E_4$ ,  $D_2$ , 4 mM  $\text{MgCl}_2$  bei 25 °C.

Die Tabelle 28 zeigt, dass keine der charakterisierten HisAFcomIII-Varianten eine verbesserte Wechselzahl im Vergleich zum Ausgangsprotein zeigt und alle Varianten außer HisAFcomIII-L2H+K144N einen leicht erhöhten  $K_{\text{M}}^{\text{PRA}}$ -Wert aufweisen. Die katalytische Effizienz der Referenzvariante wird somit nur von HisAFcomIII-L2H+K144N leicht übertroffen.

Da diese charakterisierten Varianten nicht das gewünschte Ergebnis lieferten, wurde eine weitere HisAFcomIII-Variante kloniert, in der gezielt die dominierenden Austausche dieser Selektion L2H, V3I, F10Y und K144N miteinander kombiniert wurden.

#### 4.6.7.4.1 Gezielte Kombination von Austausch

Die Variante *hisAFcomIII*-L2H+V3I+F10Y+K144N wurde in pET21a kloniert, indem die Austausche L2H und V3I in Variante #3 (*hisAFcomIII*-F10Y+K144N; Tabelle 27) über den 5'-Primer 5'*hisA*-L2H+V3I eingefügt wurden. Expression, Reinigung und enzymkinetische Charakterisierung erfolgte wie bereits beschrieben (4.6.3). In Abbildung 60 ist die PRA-Sättigungskurve dieser Variante gezeigt.



**Abbildung 60: PRA-Sättigungskurve zur Quantifizierung der TrpF-Aktivität von HisAFcomIII+L2H+V3I+F10Y+K144N.**

Es wurden 2,5 bis 50 µM PRA durch 5 µM der Variante HisAFcomIII+L2H+V3I+F10Y+K144N in 50 mM HEPES, pH 7,5, E<sub>4</sub>, D<sub>2</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub> bei 25 °C umgesetzt. In jedem Ansatz befand sich ein 30-facher molarer Überschuss an PRPP über AA sowie 1 µM yPRT und 2,5 µM tmTrpC.

Aufgetragen ist jeweils die Anfangsgeschwindigkeit  $v_i$  gegen die Konzentration des Substrates PRA. Die durchgezogene Linie zeigt das Ergebnis des Computerfits (Programm Sigma Plot) der Daten mit einer hyperbolischen Funktion.

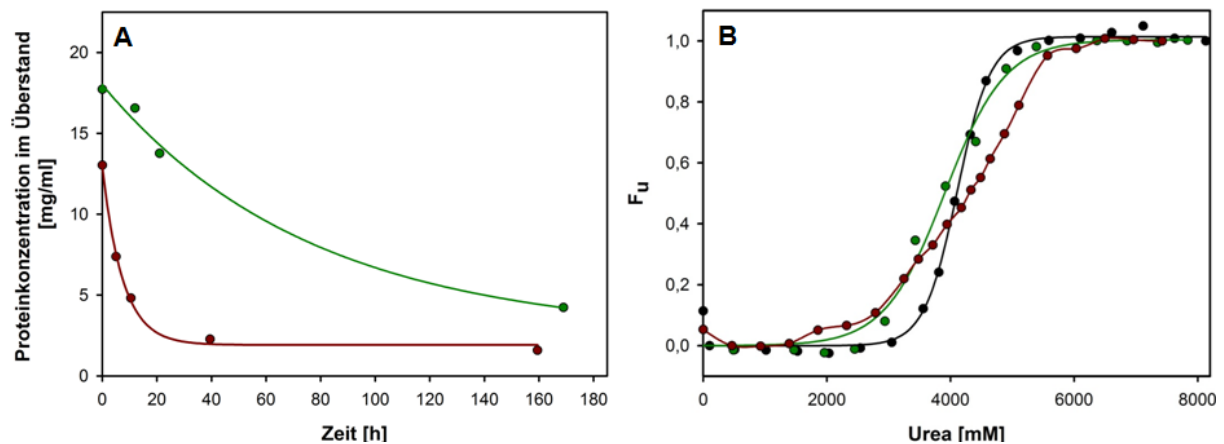
Die aus der Sättigungskurve abgeleiteten katalytischen Parameter sind in Tabelle 29 zusammengestellt.

**Tabelle 29: Steady-state enzymkinetische Parameter der TrpF-Aktivität von HisAFcomIII+L2H+V3I+F10Y+K144N im Vergleich mit dem Ausgangsprotein HisAFcomIII.**

HisAFcomIII-Variante	$k_{cat}$ [min <sup>-1</sup> ]	$K_M^{PRA}$ [µM]	$k_{cat}/K_M^{PRA}$ [min <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ]
L2H+V3I+F10Y+K144N	3,2	2,7	1185
<b>Referenz</b>			
HisAFcomIII	4,0	2,9	1425

Für die HisAFcomIII-Variante sind die durch den Computerfit der Sättigungskurve ermittelten Werte aufgelistet.  $k_{cat}$ : Wechselzahl;  $K_M^{PRA}$ : Michaelis-Menten-Konstante;  $k_{cat}/K_M^{PRA}$ : katalytischer Effizienzparameter. Die Reaktion erfolgte in 50 mM HEPES, pH 7,5, E<sub>4</sub>, D<sub>2</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub> bei 25 °C.

Die HisAFcomIII+L2H+V3I+F10Y+K144N Variante zeigt keine Verbesserungen in Hinblick auf die enzymkinetischen Parameter (Tabelle 29). Der  $k_{\text{cat}}$ -Wert ist sogar leicht verschlechtert. Dennoch stellt die Variante in anderer Hinsicht eine Verbesserung dar. Vergleicht man die Kinetik der Präzipitation von HisAFcomIII und HisAFcomIII+L2H+V3I+F10Y+K144N in 50 mM HEPES, pH 7,5 sowie die Auffaltung in Harnstoff, so fällt auf, dass sich die Stabilität durch die zusätzlichen Austausche deutlich erhöht hat (Abbildung 61).



**Abbildung 61: Vergleich der Kinetik der Präzipitation von HisAFcomIII (●) und HisAFcomIII+L2H+V3I+F10Y+K144N (●) (A) und der konformationellen Stabilität der genannten Varianten mit HisAFwt (●) durch Denaturierung in Harnstoff (B).**

**A:** Die Varianten wurden auf Eis in 50 mM HEPES, pH 7,5 inkubiert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Lösungen zentrifugiert und die Proteinkonzentration im Überstand bestimmt. In rot ist HisAFcomIII/F111S (die Position Phe111 ist in der untersuchten Variante zu einem Serin und nicht wie in HisAFcomIII zu einem Leucin ausgetauscht) und in grün ist HisAFcomIII+L2H+V3I+F10Y+K144N gezeigt. Die durchgezogenen Linien zeigen das Ergebnis eines Fits der Datenpunkte mit einer exponentiellen Funktion.

**B:** Die Messungen wurden in 50 mM KP, pH 7,5 bei 25 °C durchgeführt. Die Proben einer Messreihe enthielten 4,5 bis 5,5  $\mu\text{M}$  Protein. Das fluorimetrische Signal wurde über 15 s aufgenommen und gemittelt. Die Anregung erfolgte bei 280 nm und die Emission wurde bei 317 nm verfolgt. Die durchgezogenen Linien sollen das Auge führen. Die Farbcodierung entspricht der aus (A).

Aus den beiden Präzipitationskurven (Abbildung 61A) ergeben sich für die Varianten HisAFcomIII und HisAFcomIII+L2H+V3I+F10Y+K144N apparente Halbwertszeiten von 8,4 h und 83 h. Wenn auch die Punktedichte nicht ausreichend ist, um diese Werte absolut zuverlässig zu bestimmen, so drückt dieser Vergleich dennoch sehr deutlich die unterschiedliche Stabilität in 50 mM HEPES, pH 7,5 aus. Unterstützt wird dieses Ergebnis durch den Kooperativitätsgewinn von HisAFcomIII+L2H+V3I+F10Y+K144N bei der Denaturierung in Harnstoff (Abbildung 61B). Auf der Basis dieser Beobachtung lässt sich spekulieren, dass die im Komplementationstest gefundenen Varianten (Tabelle 26) nicht aufgrund einer besseren Katalyse selektiert wurden, sondern vielmehr wegen einer höheren

Proteinstabilität. Dadurch könnten die selektierten Varianten eventuell in einer höheren Konzentration in der Zelle vorliegen, als es für das Ausgangskonstrukt HisAFcomIII der Fall ist. Insbesondere bei Selektionen mit Proteinen, die zu einem großen Teil unlöslich in der Zelle vorliegen, können Mutationen, die die Löslichkeit oder wie in diesem Fall die Stabilität verbessern, das Ergebnis einer Selektion verfälschen.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass durch die zusätzliche Mutations- und Selektionsrunde auf HisAFcomIII keine Austausche gefunden wurden, welche die TrpF-Aktivität deutlich weiter steigern.

Zur Selektion von verbesserten HisAFcomIII-Varianten sollten deshalb neue Strategien verfolgt werden. Zum einen sollte mit gezielter intrazellulärer Proteolyse die zytoplasmatische Konzentration von HisAF-Varianten erniedrigt und somit das Selektionsfenster für Komplementationsversuche vergrößert werden (vgl. Tabelle 24; 4.6.7.5). Zum anderen soll versucht werden, durch Sättigungsmutagenese eines ausgewählten Bereichs die TrpF-Aktivität zu verbessern. Dazu bot sich der *loop*  $\beta 5\alpha 5$  an. In diesem Bereich wurden in der ersten Selektionsrunden (4.6.2.1) die Mutationen K143E und T146M und in der zweiten Runde (4.6.7.2) F138L und K144N gefunden. Somit kann aufgrund der bisherigen Ergebnisse ein Optimierungspotenzial für diese Positionen angenommen werden (4.6.7.6).

#### 4.6.7.5 Vorversuch mit einem *ssrA*-Abbautag

Zur Erhöhung des Selektionsdrucks in einem Komplementationstest kann versucht werden, die intrazelluläre Konzentration des der Selektion ausgesetzten Enzyms zu verringern. Neuenschwander *et al.* (2007) entwickelten ein kombiniertes Selektionssystem aus regulierbarem Transkriptionslevel mittels induzierbarem Promotor und proteolytischem Abbau des zu evolvierenden Enzyms durch den *ssrA*-Abbautag. Da im Rahmen dieser Arbeit bereits mit dem pTNA-Vektor, welcher einen schwach konstitutiven Promotor besitzt, gearbeitet wurde, wurde aus dem entwickelten Selektionssystem nur die Markierung zum proteolytischen Abbau von TrpF-aktiven HisAF-Varianten mittels *ssrA*-Tag übernommen.

Um den Einfluss des *ssrA*-Abbautags auf verschiedene TrpF-aktive HisAF-Varianten zu testen, wurden PCRs (Primer: 5'pTNA-*SphI* und 3'*hisF-ssrA*) mit den Varianten *hisAFcomI* und *hisAFcomIII* durchgeführt, in denen die genannten Varianten am 3'-Ende mit dem *ssrA*-Abbautag versehen wurden.

Anschließend wurden bei 37 °C Komplementationstests mit der Positivkontrolle pTNA-*trpF*, der Negativkontrolle pTNA und den in pTNA klonierten *hisAF*-Varianten *comI* und *comIII*, jeweils mit und ohne *ssrA*-Tag, durchgeführt.

Nach Ausplattierung auf M9<sup>-</sup><sub>Amp</sub>-Selektionsplatten konnten die unterschiedlichen Wachstumszeiten bei 37 °C für die *HisAF*-Varianten ohne *ssrA*-Abbautag reproduziert werden (Tabelle 24); jedoch unterschieden sich beide *HisAF*-Varianten mit *ssrA*-Tag nicht beim Wachstum, sondern bildeten jeweils nach 64 h sichtbare Kolonien aus. Nach Erscheinen der Kolonien war weiterhin zu beobachten, dass Kolonien mit *HisAF-ssrA*-Varianten nicht in der Lage waren, zu normaler Größe heranzuwachsen. Nach 205 h besaßen sie die gleiche Größe wie nach 64 h. Da diese Ergebnisse ohne weitere Untersuchungen nicht erklärt werden können, wurde dieser Ansatz aus Zeitgründen nicht weiter verfolgt.

#### 4.6.7.6 Sättigungsmutagenese in einem ausgewählten Bereichen von *HisAF*

Um zu untersuchen, ob die auf *HisAF* bereits etablierte *TrpF*-Aktivität verbessert werden kann, wurden in der Variante *hisAFcomII* (Y140H+H75Y+D127V+D173V) die Positionen Phe138, Lys143, Lys144 und Thr146 („loop5-NNS“) dadurch randomisiert, dass an der ersten und zweiten Position jede der vier Basen (N) und an der dritten Position jeden Codons ein G oder C (S) zugelassen wurde.

Die Genbank *hisAFcomII\_loop5-NNS* wurde kloniert, indem mit dem Templat pET21a-*hisAFcomII* zunächst ein 3'-Megaprimer durch die Primer 5'*hisF\_loop5-NNS* und 3'pTNA-*HindIII* amplifiziert wurde. Anschließend wurde dieser zusammen mit 5'pTNA-*SphI* eingesetzt, um mit dem Templat pTNA-*hisAFcomII* das Volllängenkonstrukt zu amplifizieren. Da die Ausbeuten an Amplifikationsprodukt gering ausfielen, wurden auf dem amplifizierten Volllängenfragment drei weitere PCRs mit den Primern 5'*hisA-SphI* und 3'*hisF-HindIII* angesetzt („nested“ PCR, Volkov & Arnold, 2000).

Für Erstellung der Genbank wurde ein Standard-PCR Programm mit der GoTaq Polymerase verwendet. Das weitere Vorgehen entspricht dem in Kapitel 4.6.7.1 beschriebenen Verfahren. Durch Auszählen entsprechender Verdünnungen wurde eine Bankgröße von  $4,6 \cdot 10^7$  unabhängiger Varianten abgeschätzt. Das Ergebnis von 20 Kolonie-PCRs deutete auf eine Ligationseffizienz von 100 % hin.

Zur Kontrolle der Randomisierung der Codons 138, 143, 144 und 146 wurden zehn auf SOC<sub>Amp</sub>-Platten gewachsene Klone der pTNA-*hisAFcomII\_loop5*-NNS-Genbank sequenziert. Die Verteilung der Nukleotide ist in Tabelle 30 gezeigt.

**Tabelle 30: Verteilung der Nukleotide in den randomisierten Codonen von F138, K143, K144 und T146 der pTNA-*hisAFcomII\_loop5*-NNS-Genbank.**

Nukleotid	1. Position				2. Position				3. Position	
	G	A	T	C	G	A	T	C	G	C
<b>F138NNS (TTC)</b>										
<b>N</b>	1	3	4	2	5	2	1	2	5	5
<b>%</b>	10	30	40	20	50	20	10	20	50	50
<b>K143NNS (AAG)</b>										
<b>N</b>	1	6	2	1	4	5	1	0	6	4
<b>%</b>	10	60	20	10	40	50	10	0	60	40
<b>K144NNS (AAG)</b>										
<b>N</b>	2	3	2	3	4	3	2	1	8	2
<b>%</b>	20	30	20	30	40	30	20	10	80	20
<b>T146NNS (ACG)</b>										
<b>N</b>	1	3	3	3	6	2	2	0	3	7
<b>%</b>	10	30	30	30	60	20	20	0	30	70

Das wildtypische Codon ist in Klammern hinter der jeweiligen Position angegeben.

Tabelle 30 zeigt, dass nur an zwei Positionen nicht jede zugelassene Base gefunden wurde (jeweils Position 2 von K143 und T146 enthielten kein C). Dennoch kann angesichts der relativ kleinen Stichprobe davon ausgegangen werden, dass jede zugelassene Base an jeder Position zu finden ist.

#### 4.6.7.6.1 Umfasst die Genbank pTNA-*hisAFcomII\_loop5*-NNS alle theoretisch möglichen Varianten?

Für die Randomisierung der vier Positionen in der pTNA-*hisAFcomII\_loop5*-NNS Genbank entstehen durch die Wahl von NNS 32 mögliche Codons an jeder Position, anstelle von 64 möglichen Codons bei der Wahl von NNN. Dies hat den Vorteil, dass durch die 32 Codons alle 20 Aminosäuren codiert werden, aber nur noch elf redundante Codons möglich sind. Dadurch wird die Verzerrung hin zu Aminosäuren verringert, die von mehreren Codons (z. B. Serin und Arginin) codiert werden (Huang

& Santi, 1994). Zusätzlich erlaubt NNS nur noch das Stoppcodon *amber* (TAG), wodurch die Möglichkeit vorzeitiger Transkriptionsabbrüche verringert wird.

Für jeweils vier randomisierte Positionen ergibt sich für die Genbank die Anzahl theoretisch möglicher Kombinationen (K) zu:

$$K = 32^4 = 1.048.576$$

Damit sich mit einer gewissen Sicherheit alle theoretisch möglichen Genvarianten unter den Klonen befinden, sollte die Größe einer Genbank den Wert von K überschreiten. Wird dies berücksichtigt, sollte die pTNA-*hisAFcomII\_loop5*-NNS-Genbank nach Formel 21 von Moore *et al.* (1997) folgende Größe (S) haben:

$$S \geq \frac{\log(1 - 0,99)}{\log(1 - P)}$$

**Formel 21: Berechnung der Mindestgröße einer Genbank, um mit 99%iger Sicherheit alle theoretisch möglichen Genvarianten vertreten zu haben.**

P entspricht der Wahrscheinlichkeit, mit der eine Variante auftritt, entspricht also dem Kehrwert der Kombinationen K bei angenommener Gleichverteilung.

Daraus ergibt sich S zu:

$$S \geq \frac{\log(1 - 0,99)}{\log\left(1 - \frac{1}{1048576}\right)} \geq 4,8 \cdot 10^6$$

**Berechnung der Mindestgröße einer Genbank mit vier randomisierten Positionen, damit mit 99%iger Sicherheit alle Kombinationen enthalten sind.**

Das bedeutet, dass bei einer Bankgröße  $\geq 4,8 \cdot 10^6$ , mit einer 99%igen Sicherheit alle möglichen Codon-Kombinationen (1.048.576) in der Bank enthalten wären. Da die Genbank um einen Faktor 9 größer ist, kann davon ausgegangen werden, dass dies der Fall ist.

#### 4.6.7.6.2 Komplementation von $\Delta trpF$ -Zellen mit der pTNA-*hisAFcomII\_loop5*-NNS-Genbank

Die Selektion auf verbesserte *HisAFcomII*-Varianten erfolgte in  $\Delta trpF$ -Zellen bei 25 °C in gleicher Weise wie in Kapitel 4.6.7.2 beschrieben. Für alle Konstrukte konnte eine Transformationseffizienz von mind.  $1,5 \cdot 10^8$  cfu/ $\mu$ g abgeschätzt werden.

Nach 52 h konnten auf den M9<sup>-</sup>-Selektionsplatten mit den unverdünnten Zellen der pTNA-*hisAFcomII\_loop5*-NNS-Genbank vier Kolonien gezählt werden. Nach 62 h wurden auf diesen Platten jeweils ca. 500 bis 1000 weitere Kolonien und auf den mit 1:5 verdünnten Zellen bestrichenen Platten jeweils ca. 100 Kolonien pro Agarplatte

beobachtet. Die Kolonien mit dem größten Durchmesser wurden markiert. Auf den M9<sup>-</sup><sub>Amp</sub>-Kontrollplatten der Zellen mit pTNA-*hisAFcomII* war nach 80 h noch kein Wachstum zu sehen. Die Lagerung der Platten erfolgte nach 80 h Komplementationsdauer bei 4 °C.

Insgesamt wurden die Sequenzen von 20 markierten Klonen analysiert. Das Ergebnis ist in Tabelle 31 zusammengestellt.

**Tabelle 31: Ergebnis der Komplementation von  $\Delta trpF$ -Zellen mit der pTNA-*hisAFcomII*\_loop5-NNS-Genbank.**

Nr.	<i>hisAFcomII</i> _loop5-NNS-Variante				weitere Mutationen
	Phe138 (TTC)	Lys143 (AAG)	Lys144 (AAG)	Thr146 (ACG)	
1	Ile (ATC)	Thr (ACG)	Tyr (TAC)	Glu (GAG)	K93E+R227G
2	Thr (ACC)	Ser (AGC)	Ala (GCG)	Phe (TTC)	V123A+G142R+G147S
3	Leu (CTC)	Ala (GCC)	Ser (AGC)	Ser (TCG)	V3I
4	Arg (AGG)	Glu (GAG)	Lys (AAG)	Gln (CAG)	-
5	Leu (CTG)	Ser (TCC)	Pro (CCC)	Gly (GGC)	-
6	Ser (AGC)	Ser (TCG)	Ser (TCC)	Gly (GGC)	T45A+R83S
7 <sup>a</sup>	Leu (CTG)	Gly (GGG)	Met (ATG)	Gly (GGC)	-
8	Glu (GAG)	Ser (AGC)	Gly (GGG)	Leu (CTG)	-
9	Ser (AGC)	Thr (ACG)	Trp (TTG)	Asp (GAC)	-
10	Met (ATG)	Pro (CCG)	Thr (ACG)	Gly (GGG)	M136L
11	Leu (CTG)	Leu (CTG)	Ala (GCC)	Gly (GGG)	V3I
12	Cys (TGC)	Cys (TGC)	Phe (TTC)	Ser (TCC)	-
13	Thr (ACC)	Ala (GCC)	Glu (GAG)	His (CAC)	L85P
14	Val (GTC)	Asp (GAC)	Arg (AGG)	Glu (GAG)	D132G+M204T
15	Asn (AAC)	Asn (AAC)	Leu (TTG)	Ala (GCG)	V3I+E89G
16	Val (GTC)	Ile (ATC)	Glu (GAG)	Arg (CGC)	-
17	Ile (ATC)	Ser (TCC)	Gly (GGG)	Gly (GGC)	I148V
18	Arg (AGG)	Thr (ACG)	Arg (CGG)	Arg (CGC)	V3I

Die Varianten Nr. 1 bis 4 komplementierten die *trpF*-Defizienz der *E. coli* Zellen nach 52 h, die Varianten Nr. 5 bis 18 nach 64 h. Das eingebaute Codon ist in Klammern hinter der Aminosäure angegeben. Am Ende jeder Zeile sind zusätzliche Mutationen gezeigt. Stille Mutationen wurden nicht aufgeführt. <sup>a</sup>: Diese Variante wurde dreimal gefunden.



Aus Tabelle 31 lässt sich entnehmen, dass an den randomisierten Positionen Phe138, Lys 144 und Thr146 überwiegend unpolare Reste zu finden sind und an Position Lys143 polare Reste überwiegen (Tabelle 32).

**Tabelle 32: Prozentuale Anteile der gefundenen Reste in der *hisAFcomII\_loop5*-NNS-Genbank nach den chemischen Eigenschaften der Seitenketten geordnet.**

Position	unpolare Sk	polare Sk	aromatische Sk	positiv gel. Sk	negativ gel. Sk
<b>Phe138</b>	55	30	-	10	5
<b>Lys143</b>	35	55	-	-	10
<b>Lys144</b>	40	20	15	15	10
<b>Thr146</b>	50	15	5	15	15

Die Angaben sind in Prozent [%]. Unpolare Sk: aliphatische Seitenketten (Gly, Ala, Val, Leu, Ile Met); polare Sk: ungeladene Seitenketten (Ser, Pro, Thr, Cys, Asn, Gln); aromatische Seitenketten: Phe, Tyr, Trp; positiv geladene Seitenketten: Lys, His, Arg; negativ geladene Seitenketten: Asp, Glu

Deutlich unterrepräsentiert sind an allen vier Positionen aromatische Aminosäuren sowie positiv und negativ geladene Aminosäuren. Das Ergebnis des Komplementationstests wird durch die weiteren Mutationen etwas verzerrt. Mit Ausnahme des Austauschs V3I ist der Einfluss dieser Mutationen auf die TrpF-Aktivität unklar. V3I wurde bereits in Kapitel 4.6.7.2 als Austausch identifiziert, der HisAFcomIII-Varianten zur schnelleren Komplementation befähigte (Tabelle 26).

Um alle gefundenen *hisAFcomII\_loop5*-Varianten im direkten Vergleich betrachten zu können, wurde eine Retransformation von  $\Delta trpF$ -Zellen durchgeführt. Dazu wurden pTNA-*hisAFcomII* und pTNA-*hisAFcomIII* als Positivkontrollen und pTNA als Negativkontrolle verwendet. Es wurden alle 18 gefundenen HisAFcomII\_loop5-Varianten (Tabelle 31) in die Retransformation eingesetzt. Alle Konstrukte wurden in einer 1:10 und einer 1:10.000 Verdünnung auf großen M9<sup>-</sup>-Selektionsplatten, die in sechs gleich große Sektoren aufgeteilt waren, ausplattiert. Die Inkubation erfolgte abweichend von der Selektion der Genbank bei 30 °C.

Das Ausgangskonstrukt HisAFcomII komplementierte die *trpF*-Defizienz der *E. coli* Zellen nach 55 h, die Variante HisAFcomIII nach 41 h. Alle 18 isolierten HisAFcomIII-loop5-Varianten komplementierten die *trpF*-Defizienz bereits nach 24 h. Dabei bildeten die folgenden sieben Varianten die größten Kolonien (Durchmesser > 1 mm nach 41 h; Tabelle 33):

**Tabelle 33: Ergebnis der Komplementation nach Retransformation von  $\Delta trpF$ -Zellen mit den selektierten pTNA-*hisAFcomII\_loop5*-Varianten bei 30 °C.**

Nr.	HisAFcomII_loop5-Variante				weitere Mutationen
	Phe138	Lys143	Lys144	Thr146	
1	Ile	Thr	Tyr	Glu	K93E+R227G
3	Leu	Ala	Ser	Ser	V3I
5	Leu	Ser	Pro	Gly	-
7	Leu	Gly	Met	Gly	-
11	Leu	Leu	Ala	Gly	V3I
14	Val	Asp	Arg	Glu	D132G+M204T
17	Ile	Ser	Gly	Gly	I148V

#### 4.6.7.6.3 Expression, Reinigung und *in vitro* Charakterisierung selektierter HisAF-comII\_loop5-Varianten

Die Varianten #3, #5, #7, #11 und #17 wurden über PCR mit Hilfe der Primer 5'*hisA*-NdeI und 3'*hisF*-NotI in pET21a umklont, wodurch die Varianten #3 und #11 den zusätzlichen Austausch V3I verloren. Die Variante #1 sollte aufgrund des schnellen Wachstums nach 52 h (Tabelle 31) trotz ihrer zusätzlichen Austausche charakterisiert werden, während Variante #14 unberücksichtigt blieb. Nach vollständiger Sequenzierung der umklonten Varianten zeigte sich, dass der zusätzliche Austausch I148V bei Variante #17 wieder entfernt war. Möglicherweise war die Sequenzierung nach dem Komplementationstest an dieser Position fehlerhaft. Für Variante #5 wurden nach Umklonierung in pET21a folgende Austausche für die randomisierten Positionen gefunden: Val138+Ala143+Leu144+Asp146 (#5'). Unter Umständen lag bei Variante #5 ein Mischklon vor. Um die ursprünglich gefundene Sequenz von Variante #5 (Tabelle 31 und Tabelle 33) ebenfalls exprimieren zu können, wurde die DNA eines Klons von #5 aus der Retransformation isoliert und ebenfalls in pET21a umklont. Alle Varianten wurden heterolog in *E. coli* T7 Express Rosetta Zellen exprimiert, über Nickel-Chelat-Affinitätschromatografie gereinigt und anschließend enzymkinetisch charakterisiert. Die aus den PRA-Sättigungskurven (nicht gezeigt) abgeleiteten katalytischen Parameter sind in Tabelle 34 aufgelistet.

**Tabelle 34: Steady-state enzymkinetische Parameter der TrpF-Aktivität der selektierten HisAFcomII-loop5-Varianten.**

HisAFcomII_loop5-Variante	$k_{\text{cat}}$ [min <sup>-1</sup> ]	$K_M^{\text{PRA}}$ [μM]	$k_{\text{cat}}/K_M^{\text{PRA}}$ [min <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ]
#1: K93E+F138I+K143T+K144Y +T146E+R227G	1,8	3,5	641
#3: F138L+K143A+K144S+T146S	5,9	4,2	1405
#5: F138L+K143S+K144P+T146G	3,9	3,7	1062
#5': F138V+K143A+K144L+T146D	6,4	2,5	2560
#7: F138L+K143G+K144M+T146G	4,5	4,6	978
#11: F138L+K143L+K144A+T146G	4,6	5,2	885
#17: F138I+K143S+K144G+T146G	1,8	4,1	439
<b>Referenz</b>			
HisAFcomII	2,5	13,9 <sup>a</sup>	181,3
HisAFcomIII	4,0	2,9	1425

Für jede Variante sind die durch den Computerfit der Sättigungskurve ermittelten Werte aufgelistet.  $k_{\text{cat}}$ : Wechselzahl;  $K_M^{\text{PRA}}$ : Michaelis-Menten-Konstante;  $k_{\text{cat}}/K_M^{\text{PRA}}$ : katalytischer Effizienzparameter. Die Reaktion erfolgte in 50 mM HEPES, pH 7,5, E<sub>4</sub>, D<sub>2</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub> bei 25 °C. **HisAFcomII**: Y140H+H75Y+F111L+D127V+D173V; **HisAFcomIII**: Y140H+H75Y+F111S+D127V+K143E+T146M+D173V  
<sup>a</sup>: apparenter  $K_M^{\text{PRA}}$ -Wert (es waren >0,09 mM P<sub>i</sub> im Reaktionsansatz enthalten)

Betrachtet man die in Tabelle 34 aufgelisteten katalytischen Parameter der HisAFcomIII\_loop5-Varianten, kann mit Ausnahme der Varianten #1 und #17 eine leichte Verbesserung des  $k_{\text{cat}}$ -Wertes im Vergleich zum Ausgangsprotein HisAFcomII festgestellt werden. Gleichzeitig kann eine Erniedrigung des  $K_M^{\text{PRA}}$ -Wertes beobachtet werden. Dies führt für Variante #5' zu einer mehr als zehnmal höheren katalytischen Effizienz im Vergleich zum Ausgangsprotein HisAFcomII. Jedoch liegt diese mit 2560 min<sup>-1</sup>mM<sup>-1</sup> etwa im Bereich von HisAFcomIII+L2H+K144N mit 2475 min<sup>-1</sup>mM<sup>-1</sup> (Tabelle 28). Aus Kapitel 4.6.6.2 ist bekannt, dass die quantitative Entfernung von Orthophosphat aus Stabilitätsgründen bei HisAFcomII nicht möglich war, jedoch bei den charakterisierten HisAFcomII\_loop5-Varianten. Dies deutet darauf hin, dass die Selektion dieser Varianten – wie bereits in Kapitel 4.6.7.4.1 für die HisAFcomIII-Varianten spekuliert (vgl. Abbildung 61) – auf eine höhere Stabilität zurückgeht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Randomisierung der Positionen Phe138, Lys143, Lys144 und Thr146 die katalytische Effizienz von HisAFcomII um etwa eine Größenordnung gesteigert werden konnte, jedoch im Vergleich zu HisAFcomIII keine wesentliche Verbesserung erzielt wurde.

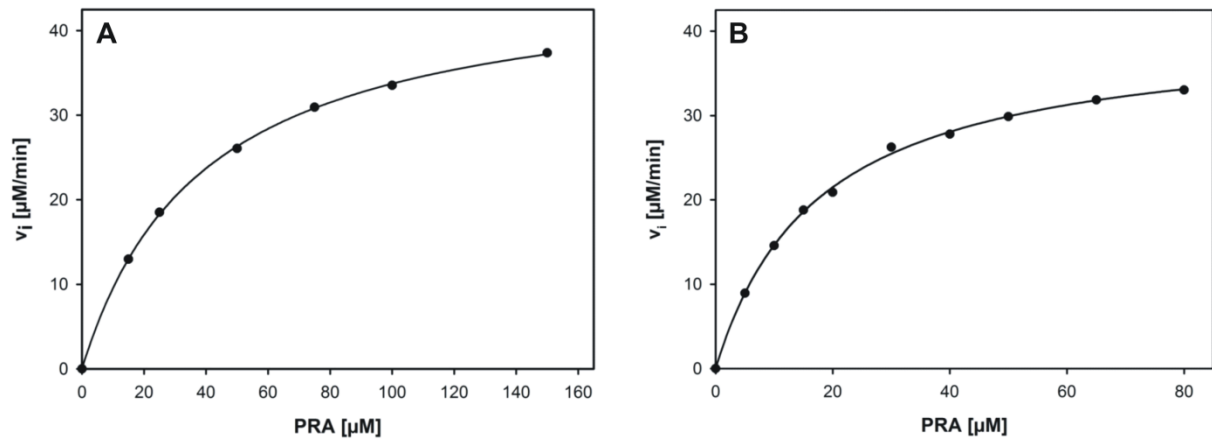
#### **4.6.8 Einfluss gefundener Austausche auf die TrpF-Aktivität von HisA-H75Y+F111S+D127V und HisF-D130V**

##### **4.6.8.1 Einfluss auf die TrpF-Aktivität von HisA-H75Y+F111S+D127V**

Aus Jürgens *et al.* (2000) war bekannt, dass die TrpF-Aktivität von HisA-D127V durch die beiden Austausche H75Y und F111S deutlich gesteigert wird. Allerdings konnte die Funktion dieser zusätzlichen Austausche, die weit entfernt vom aktiven Zentrum liegen, nicht erklärt werden. Da in dieser Arbeit beide Positionen bei der TrpF-Selektion von HisAF erneut gefunden wurden (H75Y und F111L; Tabelle 14), wurde HisA-H75Y+F111S+D127V erneut enzymkinetisch vermessen.

Weiterhin führt in HisAF der alleinige Austausch D173V zu TrpF-Aktivität (Tabelle 17). Der Rest Asp173 in HisAF entspricht Asp176 in HisF, das dort als Teil der C-terminalen Phosphatbindestelle identifiziert wurde (Lang *et al.*, 2000). Der in Lage und Funktion zu Asp176 in HisF entsprechende Rest ist Asp169 in HisA. Da gezeigt werden konnte, dass in HisAF die Austausche D127V und D173V synergistisch zusammenwirken (4.6.6.1; Tabelle 19), wurde zur weiteren Erhöhung der TrpF-Aktivität von HisA-H75Y+F111S+D127V zusätzlich der Austausch D169V eingeführt. Die Klonierung erfolgte über OE-PCR auf dem Templat pET21a-*hisA*-H75Y+F111S+D127V mit den Mutagenisierungsprimern 5'- und 3'-*hisA*-D169V und den endständigen Genprimern 5'-*hisA*-NdeI und 3'-*hisA*-NotI. Die Expression von HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V erfolgte in *E. coli* T7 Express Rosetta Zellen.

Die Präparation der gezeigten HisA-Varianten erfolgte in gleicher Weise wie für die HisAF-Varianten. Dazu erfolgte die Reinigung über Nickel-Chelat-Affinitätschromatografie mit anschließender zweimaliger Dialyse gegen 5 l 5 mM KP, pH 7,5. Für die Aktivitätsmessungen wurde von den HisA-Varianten die benötigte Menge in 50 mM HEPES, pH 7,5 umgepuffert. Somit wurde eine kompetitiv-inhibitorische Wirkung durch Orthophosphat im Reaktionsansatz vermieden. Die aufgenommenen PRA-Sättigungskurven sind in Abbildung 62 dargestellt.



**Abbildung 62:** PRA-Sättigungskurven zur Quantifizierung der TrpF-Aktivität von HisA-H75Y+F111S+D127V (A) und HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V (B).

Es wurden 15 bis 150  $\mu\text{M}$  PRA durch 2,5  $\mu\text{M}$  der Variante HisA-H75Y+F111S+D127V und 5 bis 80  $\mu\text{M}$  PRA durch 0,5  $\mu\text{M}$  HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V in 50 mM HEPES, pH 7,5,  $E_4$ ,  $D_2$ , 4 mM  $\text{MgCl}_2$  bei 25 °C umgesetzt. In jedem Ansatz befand sich ein 30-facher molarer Überschuss an PRPP über AA sowie 1  $\mu\text{M}$  yPRT und 2,5  $\mu\text{M}$  tmTrpC.

Die durchgezogene Linie zeigt das Ergebnis des Computerfits (Programm Sigma Plot) der Daten mit einer hyperbolischen Funktion.

Die aus den Sättigungskurven abgeleiteten katalytischen Parameter zeigt Tabelle 35.

**Tabelle 35:** *Steady-state* enzymkinetische Parameter der TrpF-Aktivität von HisA-H75Y+F111S+D127V und HisA-H75Y+F111S+D169V im Vergleich zu ausgewählten Referenzproteinen.

Protein	$k_{\text{cat}}^{\text{PRA}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$K_{\text{M}}^{\text{PRA}}$ [ $\mu\text{M}$ ]	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{PRA}}$ [ $\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ]
HisA-H75Y+F111S+D127V	$7,0 \pm 2,2$	$35,2 \pm 4,1$	$195,2 \pm 39,2$
HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V	$67,3 \pm 3,6$	$16,2 \pm 1,7$	$4336 \pm 333,0$
<b>Referenzen</b>			
HisAFcomIII	4,0	2,9	1425
HisA-H75Y+F111S+D127V <sup>(1)</sup>	>2,94	>100	29,4
HisA-D127V+D169A <sup>(2)</sup>	1,7	21	81
ecTrpF <sup>(3)</sup>	2070	12,2	$1,7 \cdot 10^5$
scPriA <sup>(4)</sup>	720	4	$1,8 \cdot 10^5$
tmTrpF <sup>(3)</sup>	222	0,28	$7,9 \cdot 10^5$
	$k_{\text{cat}}^{\text{ProFAR}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$K_{\text{M}}^{\text{ProFAR}}$ [ $\mu\text{M}$ ]	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{ProFAR}}$ [ $\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ]
tmHisA <sup>(5)</sup>	40,2	0,6	$6,7 \cdot 10^4$

Mittelwert und Standardabweichung der aus drei (HisA-H75Y+F111S+D127V) bzw. sechs (HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V) unabhängig gemessenen Sättigungskurven ermittelten Werte.  $k_{\text{cat}}$ : Wechselzahl;  $K_{\text{M}}^{\text{PRA}}$ : Michaelis-Menten-Konstante;  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{PRA}}$ : katalytischer Effizienzparameter. Die Reaktion erfolgte in 50 mM HEPES, pH 7,5,  $E_4$ ,  $D_2$ , 4 mM  $\text{MgCl}_2$  bei 25 °C. <sup>(1)</sup>: Daten aus Jürgens *et al.* (2000); <sup>(2)</sup>: Daten aus Dumm (2006); <sup>(3)</sup>: Daten aus Sterner *et al.* (1996); <sup>(4)</sup>: Daten aus Kuper *et al.* (2005); <sup>(5)</sup>: Daten aus Henn-Sax *et al.* (2002).

Der publizierte  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{PRA}}$ -Wert von HisA-H75Y+F111S+D127V liegt deutlich unter dem in dieser Arbeit gemessenen. Dies liegt vermutlich daran, dass Jürgens *et al.* (2000) aus dem Lagerungspuffer (50 mM KP, pH 7,5) stammendes Orthophosphat vor der Aktivitätsmessung nicht vollständig entfernten und durch diesen kompetitiven Inhibitor der  $K_{\text{M}}^{\text{PRA}}$ -Wert erhöht wurde. Tatsächlich konnte in den damaligen Messungen keine Substratsättigung erreicht werden, weshalb der katalytische Effizienzparameter aus der Steigung des linearen Teils der Sättigungskurve ermittelt werden musste.

Betrachtet man die Variante HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V so fällt der deutlich verbesserte  $k_{\text{cat}}$ -Wert von  $67,3 \text{ min}^{-1}$  im Vergleich zu  $7,0 \text{ min}^{-1}$  ohne den Austausch D169V auf. Damit liegt die Wechselzahl für den PRA-Umsatz von HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V bei  $25^\circ\text{C}$  über dem ProFAR-Umsatz von wildtypischem HisA, der bei der gleichen Temperatur  $40,2 \text{ min}^{-1}$  beträgt (Henn-Sax *et al.*, 2002).

Um bei der Variante HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V eine Kontamination mit ecTrpF auszuschließen, wurde das Gen über PCR mit den Primern 5'pET-*SphI* und 3'*hisA*-*Bam*HI in pQE70 umklontiert, in dem tryptophanoperonfreien *E. coli* Stamm KK8 heterolog exprimiert und anschließend über Nickel-Chelat-Affinitätschromatografie gereinigt. Die aus der PRA-Sättigungskurve abgeleiteten katalytischen Parameter dieser Präparation entsprachen denen aus den anderen fünf Sättigungskurven und flossen in die Bestimmung der Mittelwerte für  $k_{\text{cat}}$  und  $K_{\text{M}}^{\text{PRA}}$  in Tabelle 35 ein.

In früheren Arbeiten wurde der Einfluss einzelner Austausche in HisA auf den Umsatz von PRA untersucht, was in folgender Übersicht zusammengestellt wurde:

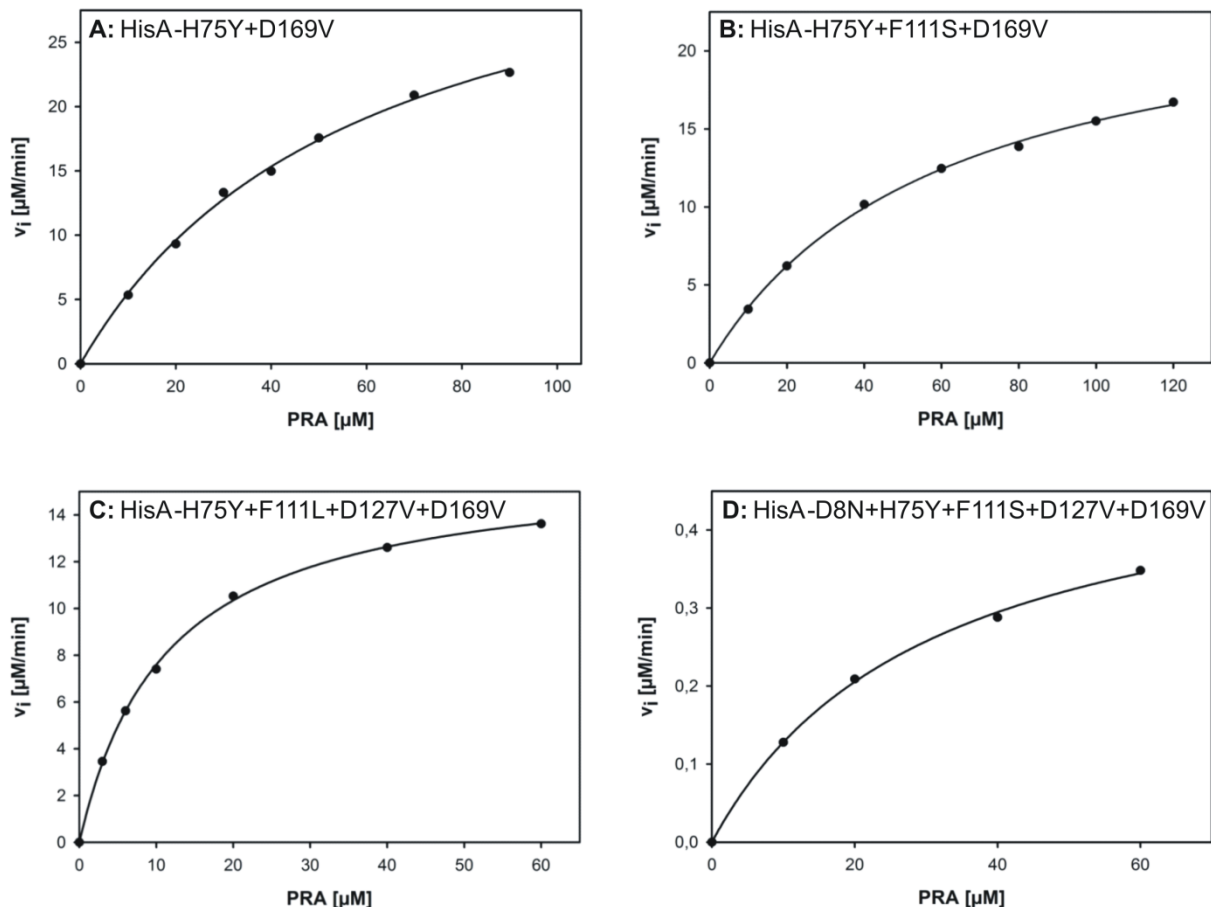
Austausch in HisA	PRA Umsatz	Quelle
H75Y	sehr gering	Jürgens (2000)
F111S	unklar	Jürgens (2000)
D127V	ja	Jürgens <i>et al.</i> (2000)
D8N+D127V	nein	Leopoldseder <i>et al.</i> (2004)
D169V	nein	Dumm (2006)

Um den Einfluss der einzelnen Austausche in verschiedenen Kombinationen auf die TrpF-Aktivität zu untersuchen, wurden folgende HisA-Varianten hergestellt:

- A. HisA-H75Y+D169V
- B. HisA-H75Y+F111S+D169V
- C. HisA-H75Y+F111L+D127V+D169V
- D. HisA-D8N+H75Y+F111S+D127V+D169V

Die Klonierung aller vier Varianten erfolgte in pET21a über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *NotI*. Die Klonierung von Variante A erfolgte durch die Herstellung der Megaprimer 5'MP-H75Y durch die Primer 5'*hisA-NdeI* und 3'*hisA-H75Y* sowie 3'MP-D169V durch 5'*hisA-D169V* und 3'*hisA-NotI*. Auf dem Templat pET21a-*hisA* erfolgte die Amplifikation von *hisA-H75Y+D169V* mit den genannten Megaprimern. Die Amplifikation von Variante B erfolgte über OE-PCR mit dem Templat pET21a-*hisA-H75Y+F111S+D127V+D169V* unter Verwendung der 5'- und 3'-*hisA-D127*-Primer und der endständigen Genprimer 5'*hisA-NdeI* und 3'*hisA-NotI*. Variante C wurde ebenfalls über OE-PCR mit dem Templat pET21a-*hisA-H75Y+F111S+D127V+D169V*, den Mutagenisierungsprimern 5'- und 3'*hisA-F111L* und den gleichen endständigen Genprimern wie für Variante B amplifiziert. Variante D wurde mit dem gleichen Templat wie für Variante C und den endständigen Genprimern 5'*hisA-D8N* und 3'*hisA-NotI* amplifiziert.

Die Präparationen der Varianten A–D erfolgten in gleicher Weise wie für HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V beschrieben und wurden anschließend enzymkinetisch charakterisiert (Abbildung 63).



**Abbildung 63: PRA-Sättigungskurven zur Quantifizierung der TrpF-Aktivität von HisA-H75Y+D69V (A), HisA-H75Y+F111S+D169V (B), HisA-H75Y+F111L+D127V+D169V (C) und HisA-D8N+H75Y+F111S+D127V+D169V (D).**

**A:** Es wurden 10 bis 90  $\mu\text{M}$  PRA durch 10  $\mu\text{M}$  der angegebenen HisA-Variante umgesetzt.

**B:** Es wurden 10 bis 120  $\mu\text{M}$  PRA durch 2,5  $\mu\text{M}$  der angegebenen HisA-Variante umgesetzt.

**C:** Es wurden 3 bis 60  $\mu\text{M}$  PRA durch 0,5  $\mu\text{M}$  der angegebenen HisA-Variante umgesetzt.

**D:** Es wurden 10 bis 60  $\mu\text{M}$  PRA durch 20  $\mu\text{M}$  der angegebenen HisA-Variante umgesetzt.

Die Reaktion erfolgte in 50 mM HEPES, pH 7,5,  $E_4$ ,  $D_2$ , 4 mM  $\text{MgCl}_2$  bei 25 °C. In jedem Ansatz befand sich ein 30-facher molarer Überschuss an PRPP über AA sowie 1  $\mu\text{M}$  yPRT und 2,5  $\mu\text{M}$  tmTrpC.

Aufgetragen ist jeweils die Anfangsgeschwindigkeit  $v_i$  gegen die Konzentration des Substrates PRA. Die durchgezogene Linie zeigt das Ergebnis des Computerfits (Programm Sigma Plot) der Daten mit einer hyperbolischen Funktion.

In Tabelle 36 sind die aus den Sättigungskurven abgeleiteten Parameter aufgelistet.

**Tabelle 36: Steady-state enzymkinetische Parameter der TrpF-Aktivität von HisA-H75Y+F111S+D127V und HisA-H75Y+F111S+D169V im Vergleich zu ausgewählten Referenzproteinen.**

HisA-Variante	$k_{\text{cat}}^{\text{PRA}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$K_{\text{M}}^{\text{PRA}}$ [ $\mu\text{M}$ ]	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{PRA}}$ [ $\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ]
A: H75Y+D169V	3,8	58,9	64,5
B: H75Y+F111S+D169V	9,9	59,8	165,9
C: H75Y+F111L+D127V+D169V	32,4	11,4	2842
D: D8N+H75Y+F111S+D127V+D169V <sup>a</sup>	$0,02 \pm 0,004$	$57,3 \pm 23,7$	$0,5 \pm 0,3$
<b>Referenzen</b>			
HisA-H75Y+F111S+D127V	7,0	35,2	195,2
HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V	67,3	16,2	4335
HisA-D127V <sup>(1)</sup>	0,52	74	7,0
HisA-D127V+D169A <sup>(2)</sup>	1,7	21	81

Für die HisA-Varianten sind die durch den Computerfit der Sättigungskurve ermittelten Werte aufgelistet.  $k_{\text{cat}}$ : Wechselzahl;  $K_{\text{M}}^{\text{PRA}}$ : Michaelis-Menten-Konstante;  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{PRA}}$ : katalytischer Effizienzparameter. Die Reaktion erfolgte in 50 mM HEPES, pH 7,5,  $E_4$ ,  $D_2$ , 4 mM  $\text{MgCl}_2$  bei 25 °C.

<sup>a</sup>: Die angegebenen Parameter stellen den Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Messreihen dar. <sup>(1)</sup>: Daten aus Leopoldseeder *et al.* (2004); <sup>(2)</sup>: Daten aus Dumm (2006)

Für die Variante HisA-H75Y+D169V kann eine TrpF-Aktivität detektiert werden, die deutlich über der Aktivität von HisA-D127V liegt (Abbildung 63A und Tabelle 36). In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass alleine der Austausch H75Y HisA befähigt, PRA in CdRP umzuwandeln. Diese Umwandlung erfolgt aber deutlich langsamer als die von HisA-D127V katalysierte (Jürgens, 2000). Für HisA-D169V konnte dagegen keine TrpF-Aktivität nachgewiesen werden (Dumm, 2006). Fügt man zu HisA-H75Y+D169V den Austausch F111S hinzu, bleibt der  $K_{\text{M}}^{\text{PRA}}$ -Wert unverändert bei ca. 59  $\mu\text{M}$ , der  $k_{\text{cat}}$ -Wert verbessert sich aber von 3,8 auf 9,9  $\text{min}^{-1}$



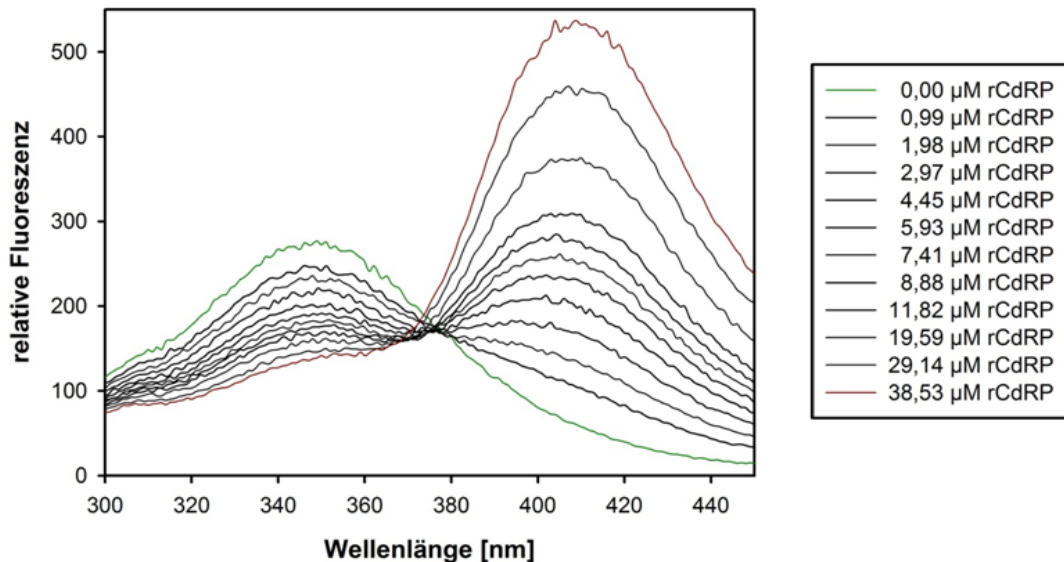
(Abbildung 63B und Tabelle 36). Damit ähnelt die Wechselzahl der Variante HisA-H75Y+F111S+D169V der von HisA-H75Y+F111S+D127V, welche  $7,0 \text{ min}^{-1}$  beträgt. Wird der Rest Phe111 gegen das in der HisAF Selektion auf TrpF-Aktivität gefundene Leucin ausgetauscht, verringert sich der  $k_{\text{cat}}$ -Wert im Vergleich mit HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V von  $67,3$  auf  $32,4 \text{ min}^{-1}$  und der  $K_{\text{M}}^{\text{PRA}}$ -Wert leicht von  $16,2$  auf  $11,4 \mu\text{M}$  (Abbildung 63C und Tabelle 36). Dieses Ergebnis ist erstaunlich, da davon ausgegangen werden kann, dass neben dem bereits diskutierten synergistischen Effekt von D127V und D173V in HisAF bzw. D127V und D169A in HisA (4.6.6.1) nun ein weiterer synergistischer Effekt bezüglich aller Austausche in HisA-H75Y+F111S+D127V+ D169V beobachtet werden kann (HisA-H75Y und HisA-F111S zeigen bestenfalls sehr schwache TrpF-Aktivität; Jürgens *et al.*, 2000). Für HisA-D127V und HisF-D130V konnte gezeigt werden, dass die TrpF-Aktivität durch den zusätzlichen Austausch D8N in HisA bzw. D11N in HisF verloren geht (Leopoldseder *et al.*, 2004). In gleicher Weise sollte bei der aktivsten Variante HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V überprüft werden, ob die TrpF-Aktivität durch den zusätzlichen Austausch D8N reduziert wird. Abbildung 63D und Tabelle 36 zeigen, dass die TrpF-Aktivität mehr als 3000-fach abnimmt, jedoch mit  $20 \mu\text{M}$  Enzym noch detektierbar ist. Damit konnte gezeigt werden, dass auch in der Variante HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V der Rest Asp8 eine Funktion bei der Katalyse für die TrpF-Reaktion übernimmt, vermutlich als allgemeine Base (Leopoldseder *et al.*, 2004). Da bereits gezeigt werden konnte, dass die Austausche F111S bzw. D127V zum Verlust der nativen HisA-Aktivität führen (Jürgens, 2000), wurde nur die Variante HisA-H75Y+D169V auf HisA-Aktivität getestet, welche jedoch nicht mehr nachweisbar war.

#### 4.6.8.2 Ligandenbindung an HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V

##### 4.6.8.2.1 Bindung von rCdRP an HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V

Analog wie für HisAF $\text{comIII}$  in Kapitel 4.6.6.4.1 beschrieben, wurde auch die Bindung von rCdRP an HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V mittels FRET-basierter Titration untersucht. Mit zunehmender rCdRP-Konzentration nahm die intrinsische Tryptophanfluoreszenz bei etwa  $345 \text{ nm}$  ab, während die des Liganden (Maximum bei  $410 \text{ nm}$ ) anstieg (Abbildung 64). Interessanterweise ist bei HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V im Gegensatz zu HisAF $\text{comIII}$  (Abbildung 55) kein

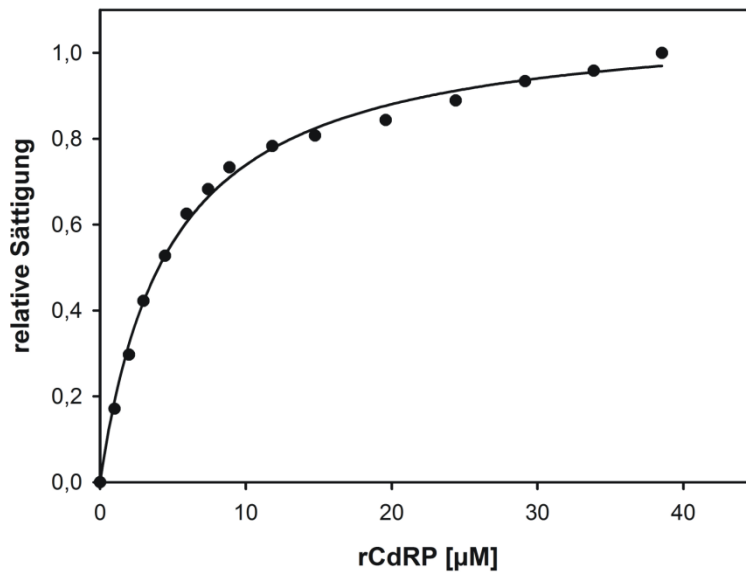
definierter isoemissiver Punkt zwischen 370 und 380 nm zu beobachten. Dies könnte darauf hindeuten, dass rCdRP möglicherweise zwei Bindestellen in der HisA-Variante besetzen kann (Abbildung 64).



**Abbildung 64: Titration von HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V mit rCdRP**

Die Fluoreszenzemissionsspektren wurden nach Anregung bei 280 nm in 50 mM HEPES, pH 7,5 bei 25 °C aufgenommen. Es wurden 5 µM HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V eingesetzt und schrittweise die angegebenen Konzentrationen an rCdRP zutitriert.

Zur Quantifizierung der Bindungsstärke wurden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten bei 340 nm über eine Minute gemittelt und nach Abzug des Nullwertes (Enzym in Puffer) gegen die rCdRP-Konzentration aufgetragen. Durch einen Fit der resultierenden hyperbolischen Bindungskurve (Programm Sigma Plot 8.0) wurde die thermodynamische Dissoziationskonstante  $K_d^{\text{rCdRP}} = 4,5 \mu\text{M}$  bestimmt (Abbildung 65).



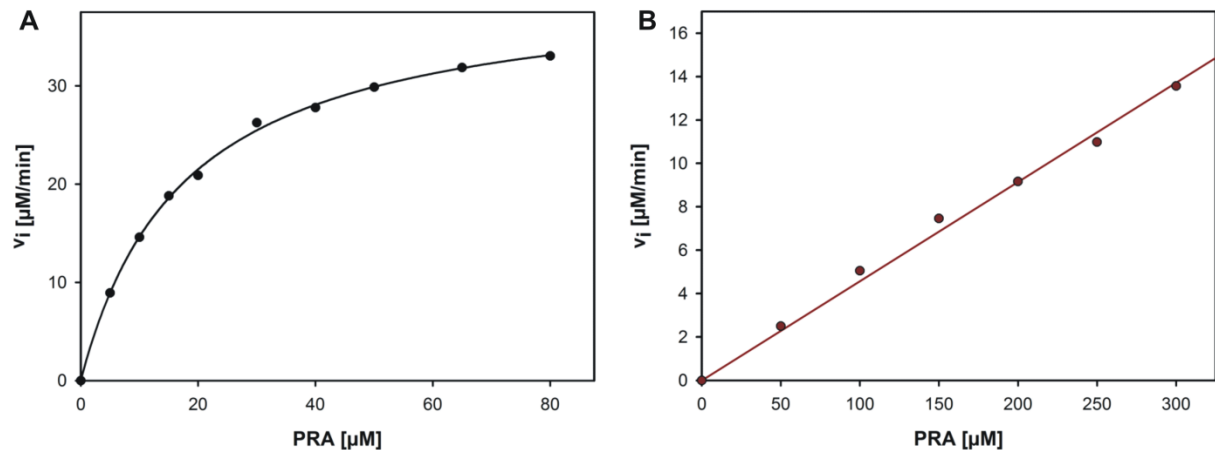
**Abbildung 65: Bindung von rCdRP an HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V.**

Die Fluoreszenzemission von 5 µM HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V bei 340 nm wurde nach Anregung bei 280 nm in 50 mM HEPES, pH 7,5 bei 25 °C über 1 min gemittelt. Die Abnahme der Fluoreszenz wurde gegen die rCdRP-Konzentration aufgetragen. Die Messpunkte wurden normiert und durch einen Fit mit einer hyperbolischen Funktion (Programm Sigma Plot 8.0) wurde die thermodynamische Dissoziationskonstante  $K_d^{rCdRP}$  zu 4,5 µM bestimmt.

Die Daten zeigen, dass HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V rCdRP somit mit vergleichbar hoher Affinität wie HisAFcomIII ( $K_d^{rCdRP} = 5,6 \mu\text{M}$ ; Abbildung 56) und das wildtypische Protein ecTrpF ( $K_d^{rCdRP} = 6,8 \mu\text{M}$ ; Hommel *et al.*, 1995) bindet.

#### 4.6.8.2.2 Kompetitive Inhibition der TrpF-Aktivität durch ProFAR bei der Variante HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V

In gleicher Weise wie für die Varianten HisAFcomII und HisAFcomIII (4.6.6.4.2), wurde die ProFAR-Bindung an HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V über die kompetitive Inhibition der TrpF-Aktivität untersucht. Dazu wurden zwei Sättigungskurven in An- und Abwesenheit von 5 µM ProFAR aufgenommen. Das Ergebnis ist in Abbildung 66 gezeigt.



**Abbildung 66: PRA-Sättigungskurven der TrpF-Aktivität von HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V zur Quantifizierung der kompetitiven Inhibition durch ProFAR.**

**A:** Es wurden 5 bis 80 μM PRA durch jeweils 0,5 μM HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V in 50 mM HEPES, pH 7,5, E<sub>4</sub>, D<sub>2</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub> bei 25 °C umgesetzt. In jedem Ansatz befand sich ein 30-facher molarer Überschuss an PRPP über AA sowie 1 μM yPRT und 2,5 μM tmTrpC.

**B:** Es wurden 50 bis 300 μM PRA durch jeweils 2,5 μM HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V in 50 mM HEPES, pH 7,5, E<sub>4</sub>, D<sub>2</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub> bei 25 °C umgesetzt. In jedem Ansatz befand sich ein 30-facher molarer Überschuss an PRPP über AA sowie 1 μM yPRT und 2,5 μM tmTrpC. Zusätzlich waren 5 μM ProFAR im Reaktionsansatz enthalten. Die Daten wurden auf 0,5 μM Enzymkonzentration normiert. Aufgetragen ist jeweils die Anfangsgeschwindigkeit  $v_i$  gegen die Konzentration des Substrates PRA. Die durchgezogene Linie zeigt das Ergebnis des Computerfits (Programm Sigma Plot) der Daten mit einer hyperbolischen (A) bzw. mit einer linearen Funktion (B).

Aus Abbildung 66 wird klar, dass der  $K_M^{\text{PRA}}$ -Wert in Anwesenheit von ProFAR so stark ansteigt, dass nur noch der lineare Teil der Sättigungskurve aufgezeichnet werden konnte. Aus der Steigung der Gerade wurde der apparente  $k_{\text{cat}}/K_M^{\text{PRA}}$ -Wert ermittelt. Unter der Annahme, dass es sich hierbei um eine reine kompetitive Inhibition handelt, und damit der  $k_{\text{cat}}$ -Wert dem in Abwesenheit von ProFAR entspricht, wurde über den Zusammenhang  $K_M^{\text{app}} = K_M(1 + [I]/K_i)$  die Inhibitions-konstante für ProFAR ( $K_i^{\text{ProFAR}}$ ) zu 0,1 μM bestimmt werden. Da der  $K_M^{\text{ProFAR}}$  für HisAwt bei 0,6 μM liegt (Tabelle 35), scheint sich die Affinität für ProFAR bei der Variante HisA-H75Y+F111S+D127V+ D169V leicht verbessert zu haben. Um dies definitiv sagen zu können, müssten jedoch die Dissoziationskonstanten  $K_d^{\text{ProFAR}}$  beider Proteine direkt gemessen werden.

#### 4.6.8.3 Die Röntgenkristallstruktur von HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V

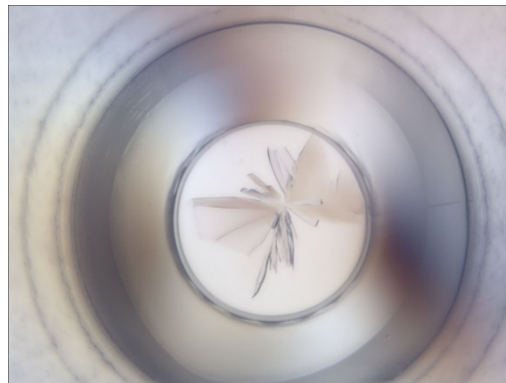
Aufgrund der hohen TrpF-Fremdaktivität der Variante HisA-H75Y+F111S+D127V+ D169V (Tabelle 36) sollte die Struktur des Proteins in Kooperation mit Dr. Birte Höcker gelöst werden. Dazu wurde das Protein in *E. coli* T7 Express Rosetta Zellen heterolog exprimiert und in einem ersten Reinigungsschritt durch Hitzebehandlung des Zellextraktes (75 °C, 15 min) effizient angereichert. Daran schloss sich eine

weitere Anreicherung über Nickel-Chelat-Affinitätschromatografie an, wodurch nach Analyse über SDS-PAGE eine Reinheit des Proteins von > 95 % erzielt werden konnte. Die HisA-Variante wurde zweimal für die Kristallisation zur Verfügung gestellt.

Reinigung 1: 55 mg aus 2 l LB Medium; Endkonzentration: 23,9 mg/ml ( $A_{280}/A_{250}$ : 2,51)

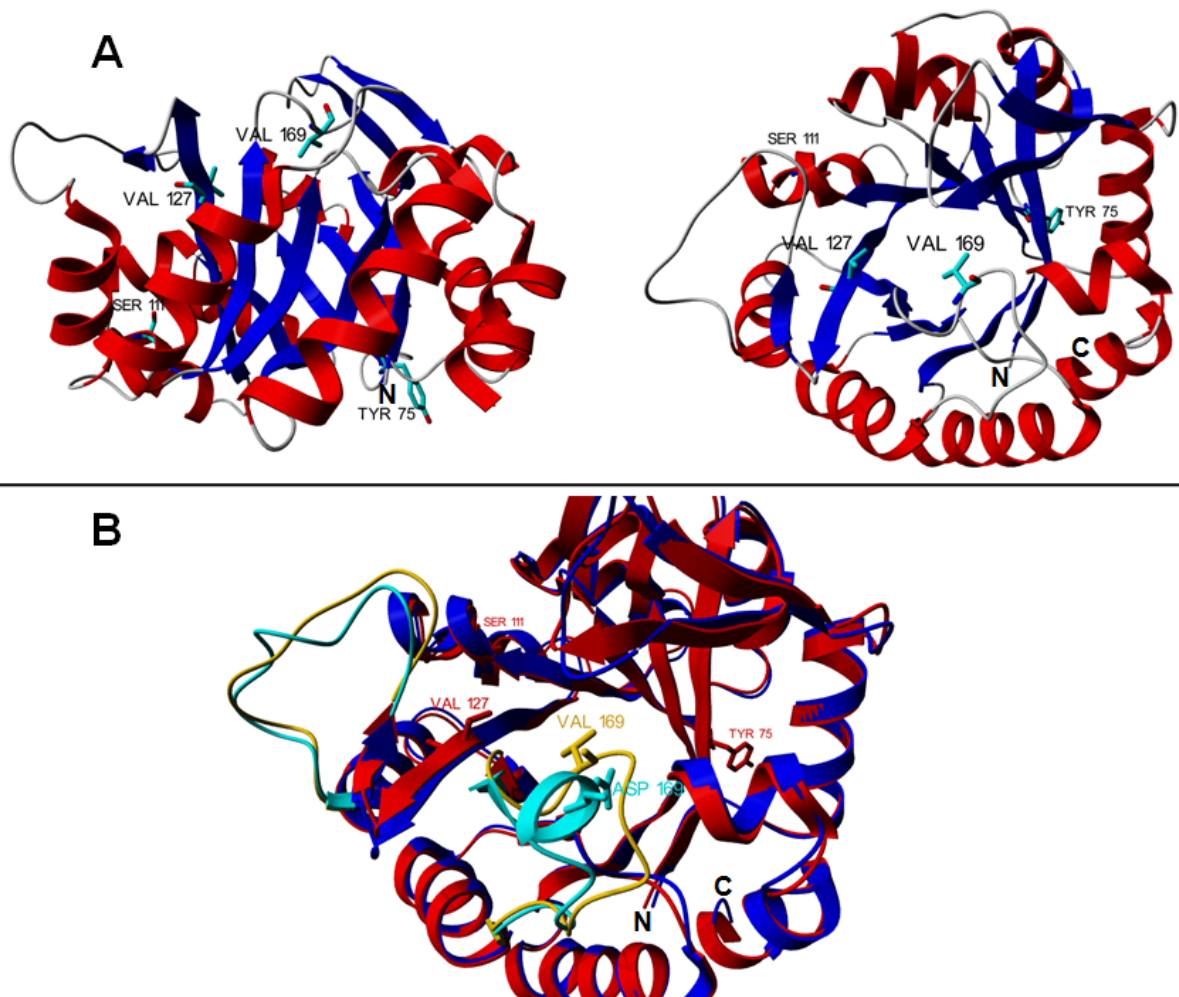
Reinigung 2: 108 mg aus 4 l LB Medium; Endkonzentration: 14,1 mg/ml ( $A_{280}/A_{250}$ : 2,56)

HisA-H75Y+F111S+D127V+D173V lag in den angegebenen Konzentrationen in 5 mM KP, pH 7,5 vor. Proteinkristalle wurden in 0,1 M Tris, pH 7,5, 25 % ( $^{w/v}$ ) PEG 3350 erhalten (Abbildung 67).



**Abbildung 67: Kristall von HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V.**

Der Kristall hat die Zelldimension  $a=49$ ,  $b=64$ ,  $c=79$ ,  $\alpha=\gamma=90^\circ$ ,  $\beta=94^\circ$  und lässt sich hinsichtlich der Symmetrie durch die Raumgruppe  $P 1 2_1 1$  beschreiben. Die erhaltenen Beugungsmuster erlaubten eine Aufklärung der Struktur bis zu einer Auflösung von 1,85 Å (Abbildung 68).



**Abbildung 68: Bänderdiagramm der Kristallstruktur von HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V.**

**A:** Kristallstruktur von HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V mit einer Auflösung von 1,85 Å in der Seitenansicht (links) und Aufsicht auf den Katalysepol (rechts). In blau sind die  $\beta$ -Stränge, in rot die  $\alpha$ -Helices und in grau die *loops* dargestellt. Die ausgetauschten Aminosäuren sind gezeigt: H75Y – Beginn von  $\beta$ -Strang 3; F111S – Beginn von  $\alpha$ -Helix 4; D127V – Ende von  $\beta$ -Strang 5; D169V – im  $\beta 6\alpha 6$ -loop ( $\alpha$ -Helix 6').

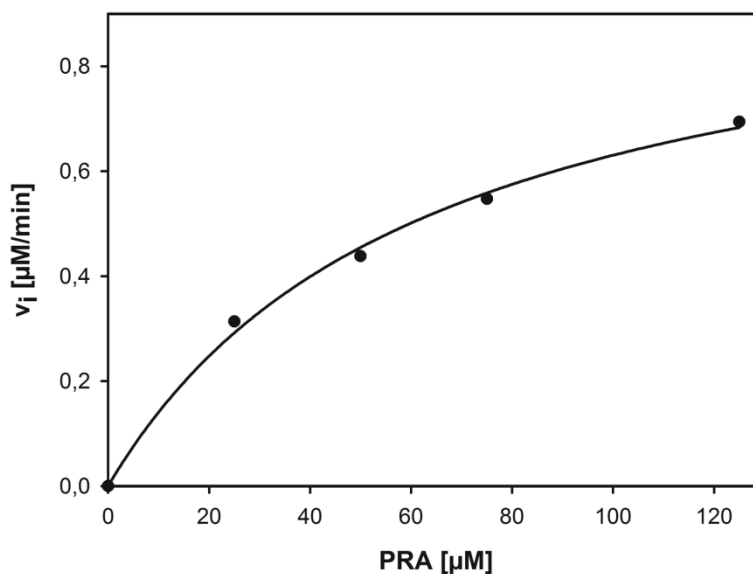
**B:** Superpositionierung von HisA (pdb: 1qo2; blau) und HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V (rot). Die Reste Tyr75, Ser111 und Val127 sind in rot dargestellt. Die *loops*  $\beta 5\alpha 5$  (Phe135–Asp145) und  $\beta 6\alpha 6$  (Ile166–Asp176) sind in hellblau (HisA) bzw. in gelb (HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V) dargestellt. Im  $\beta 6\alpha 6$ -loop sind die Reste Val169 (gelb) und Asp169 (hellblau) gezeigt.

Die Kristallstruktur der Variante HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V superpositioniert mit einem *rmsd*-Wert von 1,07 Å mit HisA (240 C $\alpha$ -Atome; Abbildung 68B). Größere Abweichungen der beiden Strukturen gibt es nur in den  $\beta 5\alpha 5$ - und  $\beta 6\alpha 6$ -loops. Die Abweichungen für den  $\beta 5\alpha 5$ -loop sind vermutlich auf Kristallisationsartefakte zurückzuführen, da dieser *loop* keine einheitliche Orientierung in den beiden Molekülen der asymmetrischen Einheit zeigt (persönliche Mitteilung Dr. Birte Höcker). Hingegen sind die deutlichen Unterschiede im  $\beta 6\alpha 6$ -loop, in dem der Austausch D169V lokalisiert ist, nicht auf Artefakte zurückzuführen, da hier eine identische Lage des *loops* in der Kristallpackung beobachtet wurde. In der

Umgebung der Austausche H75Y, F111S und D127V kommt es aufgrund der Mutationen nicht zu strukturellen Veränderungen. Aufschluss über das Zusammenwirken der vier Mutationen in Hinblick auf die hohe TrpF-Fremdaktivität der Variante sollen *Molecular Modelling*-Experimente mit dem Substrat PRA und dem Produkt CdRP der TrpF-Reaktion liefern, welche bei Abgabe dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen waren.

#### 4.6.8.4 Einfluss auf die TrpF-Aktivität von HisF-D130V

In Analogie zu HisA (4.6.8.1) sollten die im HisF-Teil von HisAF gefundenen Austausche in HisF-D130V (Leopoldseder *et al.*, 2004) eingesetzt werden, um dort eine Verbesserung der TrpF-Aktivität dieser Variante zu erreichen. Dazu wurden in HisF-D130V zusätzlich die Mutationen K146E, T149M und D176V eingeführt (entsprechen den HisAF*comIII* Austauschen K143E, T146M und D173V). Die resultierende Variante HisF-D130V+K146E+T149M+D176V wurde über OE-PCR amplifiziert und über *NdeI/NotI* in pET21a kloniert und, wie bereits für die HisA-Varianten beschrieben, in *E. coli* T7 Express Rosetta Zellen exprimiert. Die Reinigung erfolgte mittels Hitzeschritt für 20 min bei 75 °C und anschließender Anreicherung über Nickel-Chelat-Affinitätschromatografie. Das Ergebnis der enzymkinetischen Charakterisierung zeigt Abbildung 69.



**Abbildung 69: PRA-Sättigungskurve zur Quantifizierung der TrpF-Aktivität von HisF-D130V+Y143H+K143E+T149M+ D176V.**

Es wurden 25 bis 125 µM PRA durch 50 µM HisF-D130V+Y143H+K143E+T149M+D176V in 50 mM HEPES, pH 7,5, E<sub>4</sub>, D<sub>2</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub> bei 25 °C umgesetzt. In jedem Ansatz befand sich ein 30-facher molarer Überschuss an PRPP über AA sowie 1 µM yPRT und 2,5 µM tmTrpC.

Aufgetragen ist jeweils die Anfangsgeschwindigkeit  $v_i$  gegen die Konzentration des Substrates PRA. Die durchgezogene Linie zeigt das Ergebnis des Computerfits (Programm Sigma Plot) der Daten mit einer hyperbolischen Funktion.

Die abgeleiteten katalytischen Parameter listet Tabelle 37 auf.

**Tabelle 37: Steady-state enzymkinetische Parameter der TrpF-Aktivität von HisF-D130V+Y143H+K146E+T149M+D176V im Vergleich zu HisF-D130V als Referenzprotein.**

Protein	$k_{\text{cat}}$ [min <sup>-1</sup> ]	$K_M^{\text{PRA}}$ [μM]	$k_{\text{cat}}/K_M^{\text{PRA}}$ [min <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ]
HisF-D130V+Y143H+K146E+T149M+D176V	0,02	63	0,32
<b>Referenz</b>			
HisF-D130V <sup>(1)</sup>	0,011	74	0,15

Für die HisF-Variante sind die durch den Computerfit der Sättigungskurve ermittelten Werte aufgelistet.  $k_{\text{cat}}$ : Wechselzahl;  $K_M^{\text{PRA}}$ : Michaelis-Menten-Konstante;  $k_{\text{cat}}/K_M^{\text{PRA}}$ : katalytischer Effizienzparameter. Die Reaktion erfolgte in 50 mM HEPES, pH 7,5, E<sub>4</sub>, D<sub>2</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub> bei 25 °C.

<sup>(1)</sup>: Daten aus Leopoldseder *et al.* (2004).

Tabelle 37 zeigt, dass die in HisF-D130V eingeführten Austausche die katalytische Effizienz der TrpF-Aktivität nur leicht erhöhen. Es wäre denkbar, dass Reste an anderer Position eine effizientere Katalyse der TrpF-Reaktion auf dem HisF-Gerüst behindern. Aus diesem Grund müsste man mit einer *hisF*-Genbank auf TrpF-Aktivität selektieren und so mögliche Positionen finden, die die TrpF-Aktivität auf HisF verbessern. Dies war im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht mehr möglich.



## 4.7 Etablierung von HisA-, HisF- und TrpC-Aktivität auf der Chimäre HisAF

### 4.7.1 HisA- und HisF-Aktivität

Neben der bereits etablierten TrpF-Aktivität auf HisAF sollten zusätzlich die katalytischen Aktivitäten der Elternenzyme HisA und HisF auf HisAF etabliert werden. Dazu wurden die in Tabelle 38 aufgelisteten Genbanken hergestellt.

**Tabelle 38:** Übersicht der verwendeten Genbanken zur Etablierung von HisA und HisF-Aktivität auf HisAF.

Genbank	hergestellt in <i>E. coli</i>	getestet in <i>E. coli</i>
<i>malE-hisAF</i> (1,1·10 <sup>6</sup> ; 4.6.1)	XL1 Blue MRF'	<i>ΔhisA</i> (HfrG6)
		<i>ΔhisF</i> (UTH860)
<i>hisAF-Y140H+V231M</i> (1,4·10 <sup>7</sup> ; 1–4 Mutationen/Gen; Ts/Tv:1,57)	XL1 Blue MRF'	<i>ΔhisA</i> (HfrG6)
		<i>ΔhisF</i> (UTH860)
		<i>ΔhisA</i> (JW2006; KEIO)
		<i>ΔhisF</i> (JW2007; KEIO)
		<b><i>ΔhisA</i></b>
		<b><i>ΔhisF</i></b>
		<b><i>ΔhisAΔhisF</i></b>
<i>hisAFcomIII</i> (3,2·10 <sup>7</sup> ; 4.6.7.1)	<b><i>ΔhisAΔhisF</i></b>	<b><i>ΔhisA</i></b>
		<b><i>ΔhisAΔhisF</i></b>
<i>hisAF-Y140H</i> (3,6·10 <sup>7</sup> ; 1–4 Mutationen/Gen; Ts/Tv: 2,5; siehe unten)	<b><i>ΔhisAΔhisF</i></b>	<b><i>ΔhisA</i></b>
		<b><i>ΔhisF</i></b>

Unter „Genbank“ sind die verwendeten Genbanken und die jeweilige Anzahl unabhängiger Varianten angegeben. Alle Genbanken lagen in pTNA kloniert vor. Für bereits beschriebene Genbanken ist der Verweis auf das entsprechende Kapitel aufgeführt, ansonsten sind die Kenngrößen aufgelistet. Unter „hergestellt in *E. coli*“ ist der Stamm (2.1) bezeichnet, in dem die Genbank hergestellt wurde. Unter „getestet in *E. coli*“ sind die Stämme (2.1) aufgelistet, in denen Komplementationstests mit der jeweiligen Genbank durchgeführt wurden. Die fett hervorgehobenen *E. coli* Deletionsstämme wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt.

Tabelle 38 zeigt, dass die vier verwendeten Genbanken in drei verschiedenen *ΔhisA*-, in drei verschiedenen *ΔhisF*-Stämmen, sowie in dem Doppeldeletionsstamm *ΔhisAΔhisF* getestet wurden. Dies war nötig, da die Kompetenz der zunächst verwendeten Stämme *ΔhisA* (HfrG6; Matney *et al.*, 1964) und *ΔhisF* (UTH860; Goldschmidt *et al.*, 1970) nicht ausreichte, um die gesamte Größe der Genbank zu repräsentieren (Daten nicht gezeigt). Der aus der *Knockout*-Bank Keio bezogene

Stamm  $\Delta hisA$  (JW2006) erwies sich als ungeeignet für die Selektion, da die Positivkontrolle pTNA-*hisA* nicht bzw. nur sehr langsam (> 100 h) zur Komplementation der *hisA*-Defizienz befähigte. Die Information zu diesem Stamm enthält den Hinweis auf „langsames Wachstum“ aufgrund einer „toxischen“ Deletion (<http://ecoli.naist.jp/GB6/info.jsp?id=JW2006>). Es kann vermutet werden, dass die Herstellung des Stammes fehlerhaft verlaufen ist. Aus diesem Grund wurden die Deletionsstämme  $\Delta hisA$ ,  $\Delta hisF$  und der Doppeldeletionsstamm  $\Delta hisA\Delta hisF$  nach dem Protokoll von Datsenko & Wanner (2000) im Rahmen dieser Arbeit hergestellt (in Tabelle 38 fett hervorgehoben). Anschließend wurde beobachtet, dass der aus der KEIO-Bank bezogene  $\Delta hisF$ -Stamm (JW2007) und die selbst hergestellten Stämme in gleicher Weise funktionsfähig waren.

Bei der Selektion auf HisA- bzw. HisF-Aktivität wurden bei Verwendung der Genbanken, die in *E. coli* XL1 Blue MRF' Zellen hergestellt worden waren, meist nur falsch-positive Klone isoliert. Dabei handelte es sich vorwiegend um Kontaminationen mit *hisA* bzw. *hisF* aus *E. coli*, welches im pTNA-Vektor eingefügt vorlag. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass sich im *E. coli*-Genom exakt zwischen dem 3'-Ende von *hisA* und dem 5'-Start von *hisF* eine *SphI*-Schnittstelle befindet. Die *SphI*-Erkennungssequenz wird jedoch ebenfalls für die Klonierung der Genbanken in pTNA verwendet. Daraus resultierend wurde beobachtet, dass *ehisA* in umgekehrter Orientierung (mit dem 3'-Ende ab der *SphI*-Schnittstelle) in pTNA vorlag, während *ehisF* ab dieser Schnittstelle in der richtigen Orientierung in pTNA gefunden wurde. Um dieses Problem zu umgehen, wurden weitere Genbanken im  $\Delta hisA\Delta hisF$ -Stamm hergestellt. Zur Erstellung der Genbank pTNA-*hisAF*-Y140H wurde zunächst der Doppeldeletionsstamm  $\Delta hisA\Delta hisF$  mit pTNA-*hisAF*-Y140H bzw. mit pTNA transformiert und daraus die jeweilige Plasmid-DNA durch eine Midi-Präparation gewonnen (3.3.1.2). Der isolierte pTNA-*hisAF*-Y140H-Vektor fungierte als Templat für die anschließende *ep*PCR (insgesamt drei Stück; 3.3.7.4) mit den genflankierenden Primern 5'pTNA-*SphI* und 3'pTNA-*HindIII*. Der gewonnene pTNA-Vektor (2 µg) und die drei gereinigten PCR-Produkte wurden für den präparativen Verdau für 3 h bei 37 °C mit *SphI* und *HindIII* verwendet (3.3.4.1). Die Ligationsansätze (insgesamt neun Stück) wurden dann zur Transformation von 30-mal 100 µl frisch hergestellten elektrokompenten *E. coli*  $\Delta hisA\Delta hisF$ -Zellen verwendet (jeweils 6 µl Ligationsansatz zugegeben). Nach der Kur wurden die Zellen abzentrifugiert (EPPENDORF 5810R 4000 rpm, 10 min, 25 °C), in insgesamt 6 ml

SOC-Medium aufgenommen und auf 30 großen SOC<sub>Amp</sub>-Platten (Ø 14,5 cm) ausplattiert (pro Platte 200 µl Zellsuspension). Aus den gewachsenen Kolonien wurde die pTNA-*hisAF*-Y140H-Genbank isoliert (aus ca. 14 g Zellen mit drei Maxi-Präparationen, 3.3.1.2) und für Komplementationstests verwendet. Die Kenndaten der Genbank sind in Tabelle 38 gezeigt.

Bei Selektion auf HisA-Aktivität in *E. coli*  $\Delta$ *hisA* Zellen mit der pTNA-*hisAF*-Y140H-Genbank wurde nach 744 h auf M9<sup>-</sup>-Agarplatten und nach 400 h im M9<sup>-</sup>-Flüssigmedium kein Wachstum beobachtet, während pTNA-*hisA* nach 15 h im M9<sup>-</sup>-Flüssigmedium und nach 24 h auf M9<sup>-</sup>-Agarplatten die *hisA*-Defizienz der Zellen komplementierte.

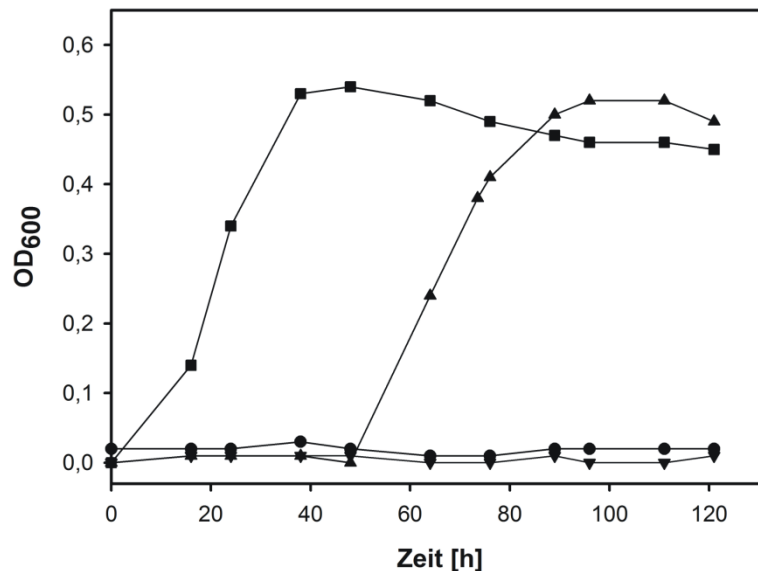
Bei Selektion auf HisF-Aktivität in *E. coli*  $\Delta$ *hisF* Zellen mit der pTNA-*hisAF*-Y140H-Genbank konnte bereits nach 44 h Wachstum auf M9<sup>-</sup>-Agarplatten und im M9<sup>-</sup>-Flüssigmedium beobachtet werden. Die Sequenzierung einzelner Klone erbrachte jedoch keine auswertbaren Ergebnisse. Beide Selektionen deuten darauf hin, dass es zumindest gelungen ist, die Kontaminationen durch *hisA* und *hisF* aus *E. coli* durch das beschriebene Protokoll zu vermeiden. Jedoch konnte keine HisA- oder HisF-aktive HisAF-Variante gefunden werden.

Die pTNA-*hisAFcomIII*-Genbank wurde ebenfalls zur Selektion auf HisA-Aktivität eingesetzt, da gezeigt werden konnte, dass HisAF<sub>comIII</sub> das HisA-Substrat ProFAR mit guter Affinität binden kann (4.6.6.4.2). Jedoch konnte auch hier keine HisA-aktive Variante isoliert werden.

Bei der Selektion auf HisF-Aktivität mit der pTNA-*hisAF*-Y140H+V231M-Genbank konnten eine Reihe von HisAF-Varianten isoliert werden, welche die *hisF*-Defizienz komplementieren konnten, u. a. HisAF-Y140H+V231M+S169C und HisAF-Y140H+V231M+I195F. Beide Varianten wurden in pET21a umklontiert, exprimiert und gereinigt. Beim *in vitro* Test auf HisF-Aktivität konnte jedoch mit jeweils 50 µM Protein keine Aktivität detektiert werden.

Die Selektion auf HisA- und HisF-Aktivität erfolgte mit der pTNA-*malE-hisAF*-Genbank gleichzeitig in dem  $\Delta$ *hisA* $\Delta$ *hisF*-Doppeldeletionsstamm. Während der Inkubationszeit von 216 h bei 37 °C konnte mit der Genbank kein Koloniewachstum auf den M9<sup>-</sup>-Agarplatten und kein Wachstum im M9<sup>-</sup>-Flüssigmedium beobachtet werden. Dennoch lieferte dieser Komplementationstest ein interessantes Ergebnis. Von HisF war bekannt, dass es schwache HisA-Aktivität besitzt, welche jedoch nicht ausreichte, um einen *hisA*-defizienten *E. coli* Stamm auf Selektionsagar zu

komplementieren (Lang *et al.*, 2000). Beim Komplementationstest der pTNA-*malE-hisAF* Genbank in  $\Delta hisA\Delta hisF$  Zellen wurde pTNA-*hisF* als Negativkontrolle auf M9<sup>-</sup>-Agarplatten sowie im M9<sup>-</sup>-Flüssigmedium mit verwendet. Das Ergebnis zeigt Abbildung 70.



**Abbildung 70: Wachstumskurven von *E. coli*  $\Delta hisA\Delta hisF$ -Zellen in M9<sub>Amp</sub>-Selektionsmedium nach Transformation mit verschiedenen in pTNA klonierten Genkonstrukten.**

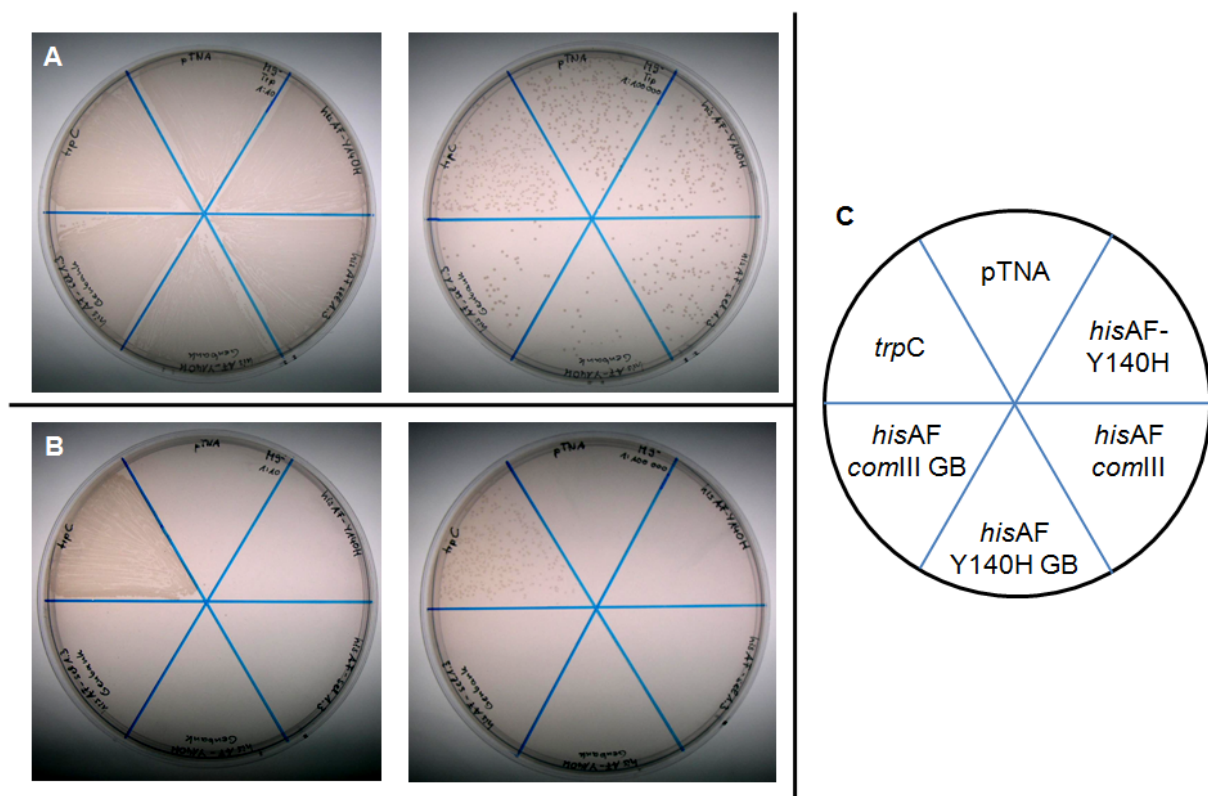
$\Delta hisA\Delta hisF$ -Zellen wurden mit folgenden pTNA-Konstrukten transformiert: *hisAhisF* (■, Positivkontrolle), *hisF* (▲) und *hisA* (▼; Negativkontrollen) und unverdünnte *hisAF*-Y140H+V231M Genbank (●).

In Abbildung 70 ist deutlich zu erkennen, dass die als Negativkontrolle eingesetzte Probe  $\Delta hisA\Delta hisF$ -pTNA-*hisF* in der Lage ist, den doppeldefizienten *E. coli* Stamm nach ca. 50 h zu komplementieren, wodurch erstmals eine Bestätigung *in vivo* der promiskuitiven HisA-Aktivität von HisF gelungen ist. Dieses Ergebnis ist ein Hinweis darauf, dass ein Komplementationstest im Flüssigselektionsmedium sensibler ist als auf Festmedium und somit die Detektion sehr geringer Aktivitäten möglich wird.

#### 4.7.2 TrpC-Aktivität

TrpC katalysiert in der Tryptophanbiosynthese die Ringschlussreaktion von 1-(o-Carboxyphenylamino)-1-Deoxyribulose-5-Phosphat (CdRP), dem Produkt der TrpF-Reaktion, zu Indol-3-Glycerol Phosphat (IGP). Da für die Variante HisAFcomIII gezeigt wurde, dass diese das Produktanalogon von TrpF bzw. das Substratanalogon von TrpC rCdRP mit guter Affinität bindet ( $K_d^{rCdRP} = 5,6 \mu M$ ; 4.6.6.4.1), wurde die hergestellte pTNA-*hisAFcomIII* Genbank (4.6.7.1) nach TrpC-

aktiven HisAF*comIII*-Varianten abgesucht. Zusätzlich wurde die Genbank pTNA-*hisAF*-Y140H auf TrpC-aktive Varianten durchsucht. Dazu wurde ein Komplementationstest mit  $\Delta trpC$ -Zellen (2.1) auf M9<sup>-</sup>-Selektionsmedium wie beschrieben durchgeführt (4.6.7.2). Nach Inkubation bei 37 °C für 40 h wurden 16 Kolonien aus der pTNA-*hisAFcomIII* Genbank auf dem Selektionsmedium gezählt. Die von Thomas Schwab (Lehrstuhl Sterner) zur Verfügung gestellte Positivkontrolle pHCE-IIB-*trpC* komplementierte die *trpC*-Defizienz nach 24 h, während die Negativkontrollen pTNA, pTNA-*hisAF*-Y140H und pTNA-*hisAFcomIII* und die Genbank pTNA-*hisAF*-Y140H während der Dauer von 267 h zu keinem Koloniewachstum führte (Abbildung 71).



**Abbildung 71: Komplementationstest mit  $\Delta trpC$ -Zellen.**

**A:** M9<sup>-</sup><sub>Trp/Amp</sub>-Agarplatten nach Ausstreichen von jeweils 30  $\mu$ l einer 1:10 (links; in allen Sektoren ist ein Bakterienrasen zu erkennen) und einer 1:100.000 (rechts; in allen Sektoren sind Einzelkolonien zu erkennen) Verdünnung von mit den genannten Konstrukten transformierten  $\Delta trpC$ -Zellen.

**B:** M9<sup>-</sup><sub>Amp</sub>-Agarplatten nach Ausstreichen von jeweils 30  $\mu$ l einer 1:10 (links; nur im Sektor mit pTNA-*trpC* ist ein Bakterienrasen zu erkennen) und einer 1:100.000 (rechts; nur im Sektor mit pTNA-*trpC* sind Einzelkolonien zu erkennen) Verdünnung von mit den genannten Konstrukten transformierten  $\Delta trpC$ -Zellen.

**C:** Plattierungsschema der in A und B dargestellten Agarplatten. Das *trpC*-Gen lag in pHCE kloniert vor. Alle anderen Konstrukte lagen in pTNA kloniert vor. GB: Genbank.

Mit den 16 isolierten Kolonien wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt, wonach neun das vollständige Gen enthielten (Daten nicht gezeigt). In Tabelle 39 sind die Mutationen aufgelistet, die bei der Sequenzierung der Varianten gefunden wurden.

**Tabelle 39: Ergebnis der Komplementation von  $\Delta trpC$ -Zellen mit der pTNA-*hisAFcomIII*-Genbank.**

Nr.	Aminosäureaustausche in <i>HisAFcomIII</i>
1 <sup>a</sup>	H48L
2	S114F
3	F10S, E37G, N145D
4	S222F, K240R
5	R20K
6	K144M

<sup>a</sup>: Diese Variante wurde viermal gefunden.

Der Austausch H48L wurde bereits bei der Selektion auf eine verbesserte TrpF-aktive *HisAFcomIII* Variante gefunden (Tabelle 26). Die anschließende Aufreinigung der Variante zeigte allerdings, dass diese sehr unlöslich und instabil ist. Ansonsten wurden zwei Positionen gefunden – K144M und N145D, die genau in dem Bereich liegen, der bereits für die TrpF-Aktivität von Bedeutung war (4.6.7.6).

Aufbauend auf den *in vivo* Ergebnissen sollen ausgewählte Varianten in nächster Zeit *in vitro* charakterisiert werden.

## 4.8 Etablierung einer Protein-Protein Interaktion zwischen HisAF und HisH

### 4.8.1 Planung und Konstruktion der HisAF-Interaktionsvarianten

Zur Detektion einer möglichen Protein-Protein Interaktion zwischen HisAF und der Glutaminase HisH, dem Interaktionspartner von HisF, wurde das *yeast-2-hybrid* System verwendet (3.2.13). Durch rationales Design sollten HisAF-Varianten generiert werden, die nach Analyse der Kontaktfläche von HisF und HisH, zur Komplexbildung mit HisH befähigt sind. Die Planung des Projekts erfolgte in Kooperation mit Felix List (Lehrstuhl Sterner).

Die Kontaktfläche von HisF und HisH wurde anhand der Kristallstruktur (pdb: 1gpw – Ketten C & D; Douangamath *et al.*, 2002) und der Software ProCheck analysiert.

Demnach beträgt die Größe der Kontaktfläche  $1086 \text{ \AA}^2$  auf Seiten von HisF und  $1139 \text{ \AA}^2$  auf Seiten von HisH, wobei 20 Reste von HisF und 19 Reste von HisH zur Interaktion beitragen (Abbildung 72). Die Kontakte zwischen beiden Proteinen werden durch neun Wasserstoffbrückenbindungen und 112 van-der-Waals Kontakte ausgebildet.



**Abbildung 72: Analyse der Kontaktfläche zwischen HisF und HisH.**

**A:** An der Interaktion von HisF und HisH beteiligte Aminosäuren. Von den 20 Resten sind 14 in der N-terminalen Hälfte und sechs in der C-terminalen Hälfte von HisF lokalisiert. Wasserstoffbrückenbindungen sind blau, van-der-Waals Kontakte sind orange gestrichelt dargestellt. Die Breite der gestrichelten Linien ist proportional zur Anzahl der van-der-Waals Kontakte. Farbkodierung: positiv geladene Reste: blau; negativ geladene Reste: rot; ungeladene Reste: grün; aliphatische Reste: grau; aromatische Reste: violett

**B:** Konservierung der an der Interaktion von HisF und HisH beteiligten Aminosäurereste: **niedrige Konservierung 1 2 3 4 5 6 7 8 9 hohe Konservierung**

In Beismann-Driemeyer *et al.* (2001) wurden folgende weitere Reste aus HisF als Interaktionspartner zu HisH vorgeschlagen: Lys4, Arg5, Glu46 und Lys99. Somit ergeben sich insgesamt 18 potenzielle Aminosäurereste aus der N-terminalen Hälfte von HisF, die an der Wechselwirkung mit HisH beteiligt sein können.

Mit Hilfe von DaliLite wurde in einem zweiten Schritt ein strukturbasiertes Sequenzalignment der N-terminalen Bereiche von HisA und HisF erstellt (Abbildung 73).





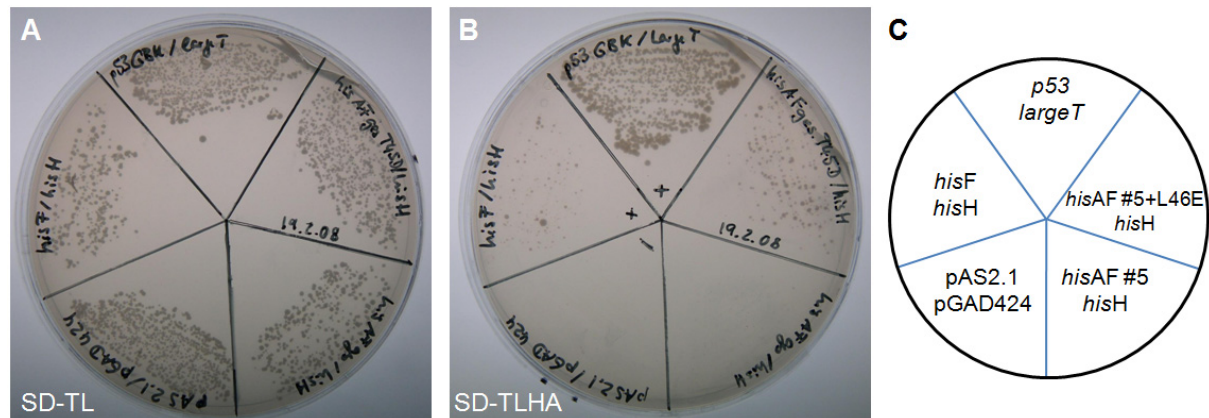
Köder (pAS2.1)	Beute (pGAD424)
pGBKT7- <i>p53</i>	pGAD424- <i>LargeT</i> Antigen
pAS2.1- <i>hisF</i>	pGAD424- <i>hisH</i>
pAS2.1- <i>hisF</i>	pGAD424- <i>trpG</i>
pAS2.1- <i>hisAF</i>	pGAD424- <i>hisH</i>
pAS2.1	pGAD424
pAS2.1- <i>hisAF</i> #1-#5	pGAD424- <i>hisH</i>

Die Konstrukte der Positivkontrolle (grün hinterlegt) und die Negativkontrolle *trpG* (rot hinterlegt) lagen bereits im angegebenen Vektor kloniert vor (Häger, 2005). Die Positivkontrolle mit dem Köder P53 und der Beute LargeT Antigen wurde verwendet, da diese Kombination eine sehr starke Interaktion im *yeast-2-hybrid* System zeigt (Häger, 2005). Bei der Negativkontrolle TrpG handelt es sich um eine Glutaminase aus der Tryptophanbiosynthese für die *in vitro* keine Interaktion mit HisF nachgewiesen werden konnte (Häger, 2005). Zusätzlich wurden als Negativkontrolle HisAF-HisH und die leeren Vektoren pAS2.1 und pGAD424 eingesetzt. Die fünf zu testenden HisAF-Varianten wurden in pAS2.1 kloniert (blau hinterlegt).

Nach Transfektion frisch kompetenter Hefezellen und Inkubation bei 30 °C konnte nach zwei Tagen für alle Konstrukte auf Selektionsplatten ohne die Auxotrophie-Marker Tryptophan und Leucin (SD-TL) Wachstum beobachtet werden, was die erfolgte Aufnahme der verschiedenen Plasmide belegt (Abbildung 74A). Nach zwei bis drei Tagen zeigte die Positivkontrolle pGBKT7-*p53* + pGAD424-*largeT* Antigen Wachstum auf Selektionsplatten ohne die Interaktionsmarker Adenin und Histidin (SD-TLHA). Die Positivkontrolle pAS2.1-*hisF* + pGAD424-*hisH* benötigte zum Wachstum auf den Selektionsplatten (SD-TLHA) drei bis fünf Tage. Während der Versuchsdauer von zehn Tagen zeigten die Negativkontrollen kein Wachstum auf SD-TLHA Selektionsplatten. Von den HisAF-Varianten war lediglich #5 in der Lage, auf SD-TLHA Selektionsplatten zu wachsen, wobei nach sieben bis zehn Tagen Kolonien sichtbar wurden. Allerdings wuchsen diese Kolonien von pAS2.1-*hisAF* #5 + pGAD424-*hisH* nicht wie die Positivkontrollen zu „normaler“ Größe heran, sondern blieben sehr klein (Abbildung 74B). Nichtsdestoweniger konnte ein erster Hinweis gewonnen werden, dass durch die Kombination aller Austausche aus den HisAF-Varianten #1–4 eine Interaktion mit HisH etabliert wurde.

Da in 4.2.1 gezeigt werden konnte, dass HisAF-*Ins*.*[M+L+A]+M1K+L2R+Y140H* mit den Austauschen T45D+L46E zu etwa 80 % löslich in der Zelle vorliegt, wurde der

Austausch L46E zusätzlich in HisAF #5 eingebracht. Gleichzeitig wurde der nicht geplante Austausch E37D bei dieser Klonierung wieder entfernt. Mit diesem Konstrukt wurde in gleicher Weise ein *yeast-2-hybrid* Test durchgeführt (Abbildung 74A & B).



**Abbildung 74: yeast-2-hybrid Test mit ausgewählten Konstrukten.**

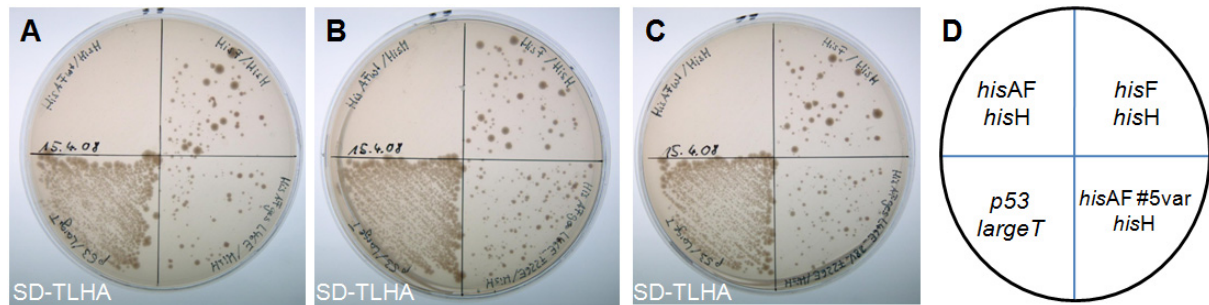
**A:** Das Wachstum auf Platten ohne die Auxotrophie-Marker Tryptophan und Leucin (SD-TL) belegt eine erfolgreiche Transfektion.

**B:** Die Positivkontrollen P53 und LargeT Antigen, sowie HisF und HisH zeigen Interaktion auf SD-TLHA-Platten. Die zu testende Chimäre HisAF #5+L46E führt nach sechs Tagen ebenfalls zu Koloniewachstum, was auf eine Interaktion mit HisH hindeutet. Die leeren Vektoren als Negativkontrolle sowie HisAF #5 zeigen zu diesem Zeitpunkt keine Interaktion. HisAF #5 bildet jedoch nach 7–10 Tagen kleine Kolonien (nicht gezeigt).

**C:** Plattierungsschema der in A und B dargestellten Platten.

Aus Abbildung 74 geht hervor, dass HisAF #5+L46E in der Lage ist, mit HisH *in vivo* zu interagieren.

Aufgrund der zahlreichen Mutationen, die in HisAF zur Etablierung einer Interaktion *in vivo* mit HisH benötigt wurden, sollten weitere Mutationen eingebracht werden, um die Stabilität und die Löslichkeit des Proteins zu verbessern. Dazu wurden in HisAF #5+L46E die Positionen Asp8 gegen Valin und Phe226 gegen Glutamat ausgetauscht (4.4). In einem weiteren *yeast-2-hybrid* Test konnte gezeigt werden, dass die zusätzlichen Mutationen die Interaktion mit HisH nicht negativ beeinflussen (Abbildung 75).



**Abbildung 75: yeast-2-hybrid Test mit Varianten von HisAF #5+L46E.**

**A:** HisAF #5+L46E

**B:** HisAF #5+L46E+F226E

**C:** HisAF #5+D8V+L46E+F226E

**D:** Plattierungsschema der in A–C dargestellten Platten.

Die Positivkontrollen P53 und LargeT Antigen sowie HisF und HisH zeigen Interaktion. Die Negativkontrolle HisAF und HisH zeigt während des Beobachtungszeitraums von acht Tagen keine Interaktion. Alle getesteten HisAF #5+L46E-Varianten zeigen vergleichbares Wachstum auf Selektivmedium (SD-TLHA) nach sieben Tagen.

Aufgrund der in Abbildung 74 und Abbildung 75 gezeigten Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass es durch die in HisAF sukzessive eingebrachten Mutationen gelungen ist, eine Wechselwirkung mit HisH *in vivo* zu etablieren. Um die Interaktion weiter zu quantifizieren, wurde die Variante HisAF #5+D8V+L46E+F226E in pET21a und in den pETDuet-Vektor umklontiert, der eine Koexpression mit HisH erlaubt. Um Fluoreszenztitrationsen *in vitro* mit den gereinigten Proteinen anschließen zu können, wurde gleichzeitig das in HisAF vorhandene Tryptophan (Trp153) gegen ein Phenylalanin ausgetauscht. Diese Charakterisierungen konnten im Rahmen der Arbeit nicht mehr durchgeführt werden, was nun durch Felix List (Lehrstuhl Sterner) erfolgen soll.

## 5 Abschließende Diskussion

---

### 5.1 Das artifizielle $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzym HisAF

Schätzungen gehen davon aus, dass in der Natur etwa 650 bis 10.000 verschiedene Proteinfaltungen vorkommen (Orengo *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1997; Wang, 1998; Zhang & DeLisi, 1998; Govindarajan *et al.*, 1999; Wolf *et al.*, 2000; Coulson & Moulton, 2002). Dabei handelt es sich um eine sehr kleine Zahl, wenn man berücksichtigt, dass ein durchschnittliches Protein aus 200 Aminosäuren besteht und sich mit 20 verfügbaren Aminosäuren  $20^{200}$  Möglichkeiten verschiedener Proteinsequenzen ergeben – eine Zahl, welche die Anzahl der Elektronen unseres Universums übersteigt (Koonin *et al.*, 2002). Betrachtet man die Verteilung der Proteinfaltungen stellt man fest, dass einer großen Anzahl an Faltungsmotiven nur wenige bzw. in einigen Fällen nur eine Proteinfamilie angehören. Demgegenüber steht eine kleine Anzahl an Faltungsmotiven, die in einer Vielzahl an Proteinfamilien verbreitet vorliegen. Dazu gehören z. B. die P-loop NTPase-, Rossmann- oder  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Faltung (Coulson & Moulton, 2002). Insbesondere die drei genannten Faltungstypen sind vermutlich sehr früh in der Evolution entstanden (Caetano-Anollés *et al.*, 2007). Von der  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Faltung wird angenommen, dass erste Vertreter dieser Faltung bereits im *last universal common ancestor* (LUCA) vorlagen (Fani *et al.*, 2007).

Um von den frühen Enzymen zu der heutigen Enzymdiversität zu gelangen, werden verschiedene Mechanismen während der molekularen Evolution als essenziell angesehen. Im Bereich der Evolution von Enzymen gelten promiskuitive Funktionen als Startpunkt für neue Spezifitäten und Aktivitäten (Jensen, 1976; O'Brien & Herschlag, 1999; Copley, 2003; James & Tawfik, 2003; Gerlt *et al.*, 2005), deren Basis Genduplikation, Genfusion und Genrekombination darstellen (Vogel *et al.*, 2005). Die Aspekte der Genduplikation und Fusion wurden bereits in früheren Arbeiten untersucht (Höcker *et al.*, 2004; Yadid & Tawfik, 2007). Im Zentrum dieser Arbeit wurde die Rekombination von Strukturmodulen anhand chimärer Proteine der  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyme HisA und HisF aus der Histidinbiosynthese analysiert. Dazu wurde zunächst die Chimäre HisAF kristallisiert, um aus der Röntgenstruktur Informationen für die Einführung von Mutationen zur Etablierung katalytischer Aktivität mittels rationalem Design zu erhalten. Jedoch lieferte die Aufklärung der

Struktur lediglich eine Auflösung von 4 Å (4.1), was nicht ausreichend ist, um rationale Designansätze zu verfolgen. Dennoch konnten aus dieser Struktur wertvolle Informationen gewonnen werden. So ist deutlich zu erkennen, dass sich die Sekundärstrukturelemente zu einem  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* zusammenlagern, welches einen vergleichbaren *Barrel*-durchmesser wie die natürlich vorkommenden  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* Enzyme HisA und HisF aufweist. Außerdem kann aufgrund der gebundenen Phosphate auf funktionelle Phosphatbindestellen geschlossen werden.

### 5.1.1 Erhöhung der Löslichkeit und Stabilität von HisAF

Da die HisAF-Struktur nicht in hoher Auflösung vorlag, wurden die Stabilitäts- und Löslichkeitseigenschaften des Proteins verbessert. Dabei kamen sowohl rationale Ansätze auf der Basis von Homologiemodellierung als auch gerichtete Evolution unter Verwendung von Reporterproteinen zum Einsatz. Das Ziel dieser Versuche war es, eine optimierte HisAF Variante zu kristallisieren und ihre Struktur in höherer Auflösung zu erhalten, als dies für das „wildtypische“ HisAF Protein möglich war. Zudem wurde davon ausgegangen, dass sich eine stabile und lösliche HisAF Variante sehr gut zur Etablierung katalytischer Aktivität eignen sollte. Rationales Design lieferte die Austausche F226E und Y140H. Durch die Mutation F226E konnte die Löslichkeit von HisAF von ca. 4 % auf ca. 8 % und gleichzeitig die konformationelle Stabilität um 5,4 kJ/mol verbessert werden (Abbildung 18; Tabelle 4). Beides war ausreichend, um ca. 45 mg sauberes Protein aus 1 l TB-Kulturmedium zu gewinnen. In HisF-C\*\*C trug der Austausch Y143H zu einer Verbesserung der Proteinlöslichkeit und Proteinstabilität bei (Seitz *et al.*, 2007). Durch Übertragung dieses Austauschs in HisAF (Y140H) verbesserte sich die Löslichkeit von HisAF auf ca. 25 % (Abbildung 21).

Parallel wurde versucht, die Löslichkeits- und Stabilitätseigenschaften von HisAF und HisFA durch gerichtete Evolution zu verbessern. Dazu wurde zunächst das von Maxwell *et al.* (1999) entwickelte CAT-Selektionssystem verwendet, bei dem ein Repertoire des zu stabilisierenden Proteins N-Terminal an die Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) fusioniert wird. Dieses System wurde bereits erfolgreich verwendet, um gefaltete und lösliche Varianten von Chimären des menschlichen und des bakteriellen Cytochrom P450-Proteins herzustellen (Sieber *et al.*, 2001; Sieber, 2003). Außerdem ist es mit Hilfe des CAT-Selektionssystems

gelingen, die Löslichkeit und Stabilität von HisF-C<sup>\*</sup>C weiter zu verbessern, was HisF-C<sup>\*\*</sup>C lieferte (Seitz *et al.*, 2007). Nachdem im Rahmen dieser Arbeit mit diesem Selektionssystem ähnliche Probleme mit falsch-positiven Klonen auftraten (4.3.1), wie bereits diskutiert (Seitz *et al.*, 2007), wurde von diesem Ansatz Abstand genommen und ein von Waldo *et al.* (1999) entwickeltes *Screening*-Verfahren verwendet (4.3.2). Dabei wird, in gleicher Weise wie beim CAT-Selektionssystem, N-Terminal ein Repertoire des zu stabilisierenden Proteins an das Reporterprotein eGFP fusioniert. Im Gegensatz zur CAT, die in einem trimeren Oligomerisierungszustand vorliegt, bildet GFP ein definiertes Monomer, wodurch Oligomerisierungseffekte vermieden werden (Hart & Tarendeau, 2006). Das *Screening* nach löslicheren bzw. stabilisierten Proteinvarianten erfolgt über die Detektion der GFP-Fluoreszenz von *E. coli* Zellen, die das Fusionsprotein exprimieren. Mit dieser Technik konnten Varianten des 42 Aminosäuren umfassenden Amyloid- $\beta$ -Peptids (A $\beta$ 42), welches bei der Entwicklung von Alzheimer eine zentrale Rolle spielt, mit verringerter Aggregationstendenz isoliert werden. Das *Screening* erfolgte in dieser Arbeit durch Inspektion von *E. coli* Kolonien auf Agarplatten (Wurth *et al.*, 2002). Alternativ dazu wurde in van den Berg *et al.* (2006) das *Screening* von *E. coli* Zellen nach einer löslicheren Variante der TEV Protease mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Dadurch wurde eine Variante der TEV Protease isoliert, die eine deutlich höhere Löslichkeit zeigte als das wildtypische Protein. Neben den genannten Beispielen zur Erhöhung der Löslichkeit wurde das GFP-System auch zur Stabilisierung von Protein mehrfach erfolgreich angewendet (Yang *et al.*, 2002; Pedelacq *et al.*, 2002).

Das im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte GFP-basierte *Screening* System in Verbindung mit Durchflusszytometrie führte zur Isolierung von zwei HisFA-Varianten, die eine verringerte Aggregationstendenz im Vergleich zum Ausgangskonstrukt zeigten. Beide Varianten wurden jedoch in unlöslicher Form in *E. coli* hergestellt und zeigten zusätzlich keine Verbesserung hinsichtlich der konformationellen Stabilität. Für HisAF konnten dagegen fünf Varianten isoliert werden, die eine Verbesserung der Löslichkeit auf 10–18 % aufwiesen (Abbildung 38 und Tabelle 10), von denen die beste Variante (HisAF-D8V) gleichzeitig eine erhöhte konformationelle Stabilität zeigte (Tabelle 12). Wurde HisAFwt stets aus der unlöslichen Zellfraktion durch Rückfaltung gewonnen, so war es bei HisAF-D8V möglich, 124 mg lösliches Protein aus einem Liter TB-Kulturvolumen zu gewinnen. Durch die anschließende

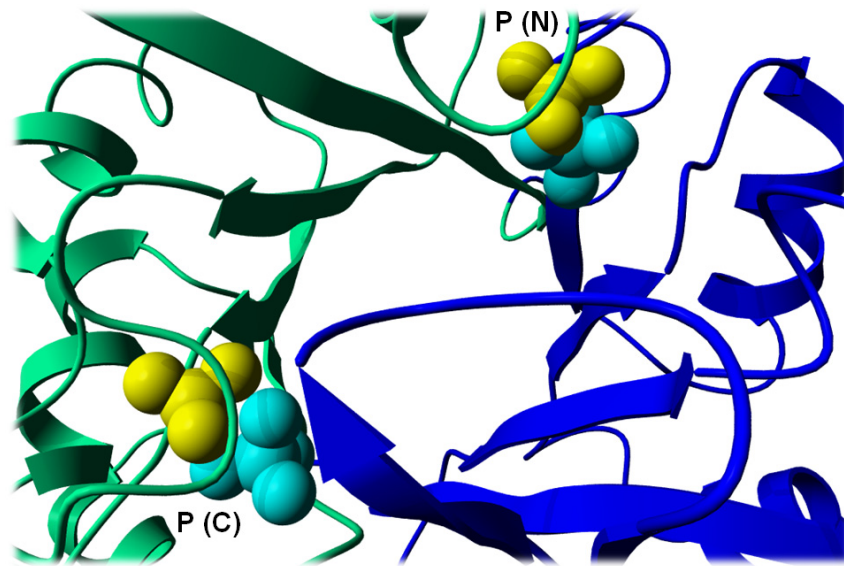
Kombination ausgewählter Austausche konnte die Löslichkeit von HisAF unter Beibehaltung der Stabilität auf 31 % gesteigert werden (HisAF-A6E+D8V) und, unter einer geringen Stabilitätseinbuße, sogar auf 69 % erhöht werden (HisAF-A6E+D8V+K13R+T25S+K113E; Abbildung 41B).

Um eine HisAF-Variante zu generieren, die in Hinblick auf Proteinlöslichkeit und konformationelle Stabilität optimiert ist, wurden Austausche aus rationalem Design (Y140H & F226E) und gerichteter Evolution (D8V) miteinander kombiniert. Das Ergebnis war eine Variante, die ähnlich löslich wie wildtypisches HisA ist (ca. 60 %; Abbildung 43). In Hinblick auf die konformationelle Stabilität befindet sich die Variante mit einem  $\Delta G^{\text{app}}(\text{H}_2\text{O})$  von 64,8 kJ/mol (Tabelle 12) im oberen Bereich der Stabilität von natürlich auftretenden globulären Proteinen, für die eine konformationelle Stabilität von 21–63 kJ/mol nachgewiesen werden konnte (Pace, 1990). Kristallisationsversuche in Kooperation mit Dr. Birte Höcker mit dieser Variante waren jedoch nicht erfolgreich.

### 5.1.2 Etablierung von TrpF-Aktivität auf HisAF

Damit ein Protein seine katalytische Aktivität ausüben kann, muss es in löslicher Form in der Zelle vorliegen. Zum Beginn der Selektionen auf katalytische Aktivität lagen die beschriebenen Austausche aus rationalem Design und gerichteter Evolution zur Verbesserung der Löslichkeit noch nicht vor. Aus diesem Grund wurde ein durch Zufallsmutagenese erzeugtes Repertoire von HisAF C-terminal an das Maltose-Binde-Protein (MBP) aus *E. coli* fusioniert. Diese Strategie basiert auf der Beobachtung, dass viele, als *inclusion bodies* anfallende Proteine durch Fusion mit MBP in löslicher Form in der Zelle vorliegen (Kapust & Waugh 1999; Fox & Waugh, 2003) und teilweise erst dadurch kristallisiert und die Struktur aufgeklärt werden konnten (Smyth *et al.*, 2003). Die Selektion auf Aktivität erfolgte mit den *E. coli* auxotrophen Stämmen *hisA*, *hisF*, *trpF* und *trpC*. Die Selektion auf HisAF-Varianten mit HisA oder HisF-Aktivität verlief erfolglos. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die gelöste Struktur von HisAF liefern. Vergleicht man die gebundenen Phosphationen von HisAF mit denen aus der Struktur von HisF, fällt auf, dass diese leicht versetzt zueinander sind (Abbildung 76).





**Abbildung 76: Vergleich der Lage der gebundenen Phosphate in HisAF und HisF.**

In blau ist die N-terminale Hälfte, in hellgrün die C-terminale Hälfte von HisAF gezeigt. In cyan sind die gebundenen Phosphate von HisAF, in gelb die gebundenen Phosphate von HisF (pdb: 1thf) gezeigt.

Die versetzte Lage der gebundenen Phosphate könnte dazu führen, dass ProFAR bzw. PRFAR nicht in exakter Ausrichtung an HisAF binden, sodass die Katalyse der jeweiligen Reaktion erschwert, bzw. unmöglich wird. Zusätzlich ist unklar, ob die katalytisch essenziellen Aspartatreste an den C-terminalen Enden der  $\beta$ -Stränge 1 und 5 von HisAF (Abbildung 47) in passender Ausrichtung für die Katalyse der HisA- bzw. HisF-Reaktion liegen.

Auf den Enzymen HisA und HisF wurde erfolgreich die TrpF-Aktivität etabliert (Leopoldseder *et al.*, 2004). Somit erschien es sinnvoll, dies ebenfalls mit der Chimäre HisAF zu versuchen. Die Selektion auf HisAF-Varianten mit TrpF-Aktivität lieferte sieben Varianten mit der Fähigkeit zur *in vivo* Komplementation (Tabelle 14 und Tabelle 15). Dabei wurde eine Variante gefunden, in der ein einziger Austausch (D173V) ausreichte, um TrpF-Aktivität auf HisAF zu etablieren. Von den sieben isolierten Varianten wurden die vier vielversprechendsten HisAF-Varianten (HisAFsell'–IV') exprimiert, gereinigt und *in vitro* charakterisiert (Tabelle 16). Durch gezielte Kombination vorteilhafter Austausche dieser Varianten wurde HisAFcomIII generiert, dessen  $k_{\text{cat}}$ -Wert von  $4,0 \text{ min}^{-1}$  (Tabelle 21) deutlich über dem der primär selektierten HisAF-Varianten ( $0,017\text{--}0,57 \text{ min}^{-1}$ ; Tabelle 17) liegt. In einer kürzlich erschienen Arbeit wurde berichtet, dass die Phosphoribosylpyrophosphat Amidotransferase (PurF) aus *E. coli* promiskuitive TrpF-Aktivität aufweist und durch gerichtete Evolution eine Variante isoliert, die eine 25-fach effizientere Katalyse als



das wildtypische Protein zeigt (Patrick & Matsumura, 2008). Die katalytische Effizienz dieser PurF-Variante beträgt  $0,02 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ . Dagegen beträgt die katalytische Effizienz der Chimäre HisAFcomIII  $1425 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ . Sie ist damit um einen Faktor  $7 \cdot 10^4$  höher als die der PurF-Mutante und nur zwei Größenordnungen unterhalb der wildtypischen TrpF Enzyme aus *E. coli* und *T. maritima*. Obwohl die Wechselzahl von TrpF aus *E. coli* etwa 500-fach größer ist, zeigt HisAFcomIII einen ca. 4-fach niedrigeren  $K_M^{\text{PRA}}$ -Wert als dieses natürlich evolvierte Enzym (Tabelle 21). In Übereinstimmung damit bindet rCdRP, das Produktanalogon von TrpF, mit leicht höherer Affinität an HisAFcomIII ( $K_d = 5,6 \text{ }\mu\text{M}$ ) als an TrpF aus *E. coli* ( $K_d = 6,8 \text{ }\mu\text{M}$ ; Tabelle 23). Eine vergleichbare gute Ligandenaffinität konnte in Fragmentstudien mit Tachylectin-2, welches der  $\beta$ -Propeller Faltung angehört, erzielt werden (Yadid & Tawfik, 2007). Bei der  $\beta$ -Propeller-Faltung handelt es sich wie bei der  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Faltung um einen sehr symmetrischen Faltungstyp, bei dem sich vier bis acht Blätter, bestehend aus bis zu vier antiparallelen  $\beta$ -Strängen, zu einer zirkulären Struktur zusammenlagern (Goraj *et al.*, 1990; Jawad & Paoli, 2002). Bei Tachylectin-2 aus dem Pfeilschwanzkrebs *Tachypleus tridentatus* ist es gelungen, die  $\beta$ -Propeller-Faltung durch Kombination kürzerer Segmente zu rekonstruieren und die Bindung des natürlichen Liganden N-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc) mit wildtypähnlicher Affinität nachzuweisen (Yadid & Tawfik, 2007).

## 5.2 Etablierung wildtypähnlicher TrpF-Aktivität auf HisA

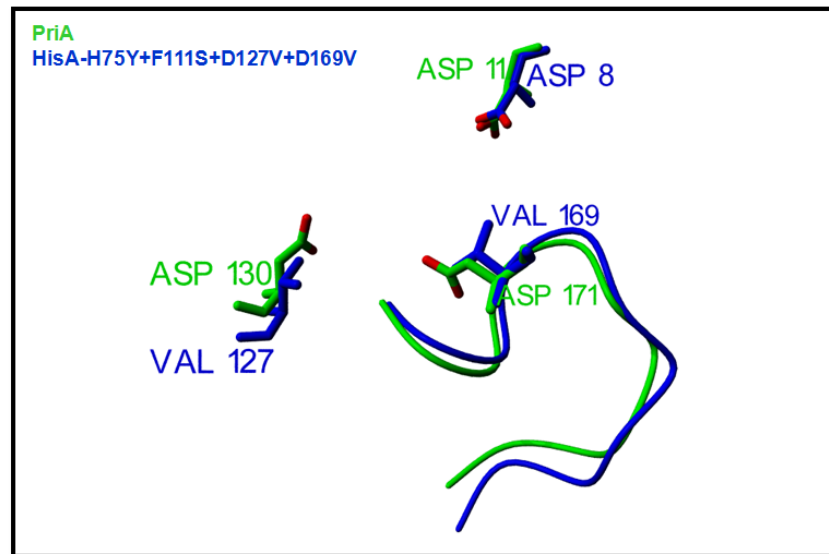
In früheren Arbeiten war es bereits gelungen, TrpF-Aktivität auf den Enzymen HisA und HisF durch den Austausch, des für die HisA- bzw. HisF-Reaktion katalytisch essenziellen, Asp127 bzw. Asp130 gegen Valin oder einen anderen ungeladenen Rest zu etablieren (Leopoldseder *et al.* 2004). Die katalytische Effizienz  $k_{\text{cat}}/K_M^{\text{PRA}}$  von HisA-D127V und HisF-D130V war jedoch mit  $7,0 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$  und  $0,15 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$  recht gering. In Jürgens *et al.* (2000) werden die zusätzlichen HisA-Austausche H75Y und F111S beschrieben, mit denen sich die katalytische Effizienz auf  $195,2 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$  verbessert (Tabelle 35). Bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Selektion auf TrpF-Aktivität von HisAF wurden mehrere Varianten mit Mutationen an Position Asp173 isoliert (Tabelle 14). Diese Position entspricht Asp176 in HisF und ist Teil der C-terminalen Phosphatbindestelle (Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001). Die korrespondierende Position in HisA ist Asp169,

welche in HisA-H75Y+F111S+D127V zu einem Valin ausgetauscht wurde. Die so erzeugte Variante HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V zeigt eine deutliche Verbesserung der katalytischen Eigenschaften bei der TrpF-Reaktion. Der  $k_{\text{cat}}$ -Wert erhöhte sich auf  $67,3 \text{ min}^{-1}$ , was etwa 30 % des wildtypischen  $k_{\text{cat}}$ -Wertes von TrpF aus *T. maritima* entspricht (Tabelle 35). Der  $K_{\text{M}}^{\text{PRA}}$ -Wert von  $16,2 \text{ }\mu\text{M}$  liegt für diese HisA-Variante ebenfalls im wildtypischen Bereich von TrpF aus *E. coli* mit  $12,2 \text{ }\mu\text{M}$ . Die aus diesen Parametern abgeleitete katalytische Effizienz liegt mit  $4335 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$  lediglich zwei Größenordnungen unter der der wildtypischen TrpF-Enzyme aus *E. coli* und *T. maritima*. Erstaunlicherweise liegt der  $k_{\text{cat}}$ -Wert von HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V für die Umsetzung von PRA zu CdRP mit  $67,3 \text{ min}^{-1}$  sogar über dem  $k_{\text{cat}}$ -Wert von wildtypischem HisA für die Umsetzung von ProFAR zu PrFAR, der  $40,2 \text{ min}^{-1}$  beträgt (Henn-Sax *et al.*, 2002).

Wie ist diese deutliche Verbesserung der TrpF-Fremdaktivität von HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V zu erklären? Aus Leopoldseder *et al.* (2004) ist bekannt, dass zur Etablierung der TrpF-Reaktion auf HisA und HisF die Entfernung der negativ-geladenen Aminosäure Asp127 bzw. Asp130 essenziell ist. Aus den Ergebnissen mit HisAF aus dieser Arbeit kann zusätzlich geschlossen werden, dass die negative Ladung von Asp173 in HisAF (und somit Asp169 in HisA) ebenfalls störend für die TrpF-Reaktion ist. Wie das zusätzliche Zusammenwirken der Austausche H75Y und F111S die TrpF-Reaktion auf HisA so deutlich verbessert, ist bisher unklar. Aus diesem Grund wurde die Kristallstruktur von HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V in Kooperation mit Dr. Birte Höcker gelöst. Darin ist deutlich zu sehen, dass der *loop*  $\beta 6\alpha 6$ , in dem sich der Austausch D169V befindet, eine andere Konformation einnimmt als in HisA (Abbildung 68). Darüber hinaus sind keine offensichtlichen strukturellen Veränderungen im Vergleich zu HisA zu erkennen. Aus diesem Grund sollen *Molecular Modelling* Experimente mit dem Substrat der TrpF-Reaktion PRA Hinweise auf die molekularen Ursachen der hohen Fremdaktivität liefern und die vermutete Rolle des Asp8 als allgemeine Base bestätigen. Da in HisA zwei Phosphatbindestellen vorliegen, PRA jedoch vermutlich nur an eine bindet, soll das *Molecular Modelling* zusätzlich Aufschluss darüber geben, welche der beiden Phosphatbindestellen verwendet wird.

Kürzlich wurde die Röntgenstruktur des bifunktionellen Enzyms PriA aus *Streptomyces coelicolor* (*S. coelicolor*) veröffentlicht (Wright *et al.*, 2008). Obwohl PriA eindeutig zur HisA-Sequenzfamilie gehört, katalysiert das Enzym die HisA-

Reaktion mit einer etwa 100-fach niedrigeren Effizienz ( $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{ProFAR}} = 1928 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ) als die TrpF-Reaktion ( $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{PRA}} = 1,8 \cdot 10^5 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ), wobei für beide Reaktionen die Reste Asp11 und Asp130 (entsprechen Asp8 und Asp127 in HisA) essenziell sind (Kuper *et al.*, 2005; Wright *et al.*, 2008). Ein Vergleich der Lage der in PriA katalytisch essenziellen Aminosäuren mit den Aminosäuren an gleicher Position in HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V zeigt Abbildung 77.



**Abbildung 77: Vergleich der katalytisch essenziellen Aminosäuren von PriA mit den an gleicher Position liegenden Aminosäuren in HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V.**

Die Reste von PriA (pdb: 2vep) sind in grün, die Reste der HisA-Variante sind in blau gezeigt. Der *loop*  $\beta 6\alpha 6$  ist in den entsprechenden Farben gezeigt (PriA: Ile168–Asp178; HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V: Ile166–Asp176). Die Reste Asp11 bzw. Asp8 liegen am C-terminalen Ende von  $\beta$ -Strang 1, die Reste Asp130 und Val127 am C-terminalen Ende von  $\beta$ -Strang 5. Die Reste Tyr75 und Ser111 der HisA-Variante sind hier nicht gezeigt, da sie sich nicht in der Nähe des aktiven Zentrums befinden.

HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V und PriA aus *S. coelicolor* superpositionieren mit einem *rmsd*-Wert von 1,48 Å. Auffällig ist, dass die Konformation des *loops*  $\beta 6\alpha 6$  in beiden Proteinen sehr ähnlich ist und sich von HisAwt unterscheidet (Abbildung 77; vgl. Abbildung 68B). Da es sich bei PriA um ein bifunktionelles HisA handelt, hätte vermutet werden können, dass auch die Mutationen in der TrpF-aktiven HisA-Variante das aktive Zentrum von PriA „nachahmen“. Dies ist aber nicht der Fall. An Position Asp130 und Asp171 von PriA sind in der HisA-Variante die Aspartate gegen jeweils Valine ersetzt (Abbildung 77). Daraus kann geschlossen werden, dass es verschiedene Möglichkeiten gibt, die TrpF-Reaktion auf dem HisA Gerüst zu etablieren. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass es sich bei PriA nicht, wie zunächst vermutet, um eine Art Vorläuferenzym von HisA und TrpF handelt, sondern um ein konvergent entstandenes Protein, auf dem beide Funktionen realisiert

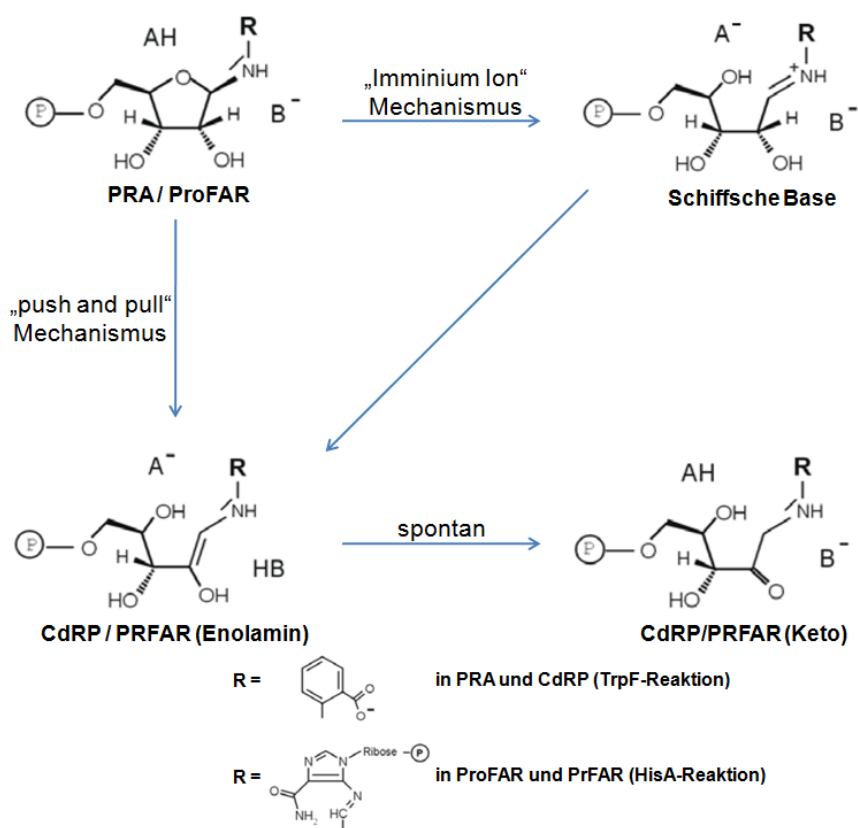
wurden. Diese Hypothese wäre im Einklang mit der Vermutung, dass  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* Proteine konvergent entstanden sein können (Koonin *et al.*, 2002). Für die Variante HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V konnte ein  $K_d^{\text{ProFAR}}$  von 0,1  $\mu\text{M}$  bestimmt werden, während der  $K_M^{\text{PRA}}$  und der  $K_d^{\text{rCdRP}}$  bei 16,2  $\mu\text{M}$  bzw. 4,5  $\mu\text{M}$  liegen (4.6.8.2). Das zeigt, dass das native HisA-Substrat mit deutlich höherer Affinität gebunden wird, als die TrpF-Liganden. Dennoch zeigt diese Variante im Gegensatz zu PriA keine HisA-Aktivität.

### 5.3 Enzymdesign: Rationales Design versus gerichtete Evolution

Natürlich vorkommende Enzyme sind unter milden Bedingungen außerordentlich effiziente Katalysatoren (Radzicka & Wolfenden, 1995), weshalb ihre Bedeutung in industriellen Anwendungen ständig zunimmt (Kirk *et al.*, 2002; Ro *et al.*, 2006; Schäfer *et al.*, 2007). So sind eine Reihe von erfolgreichen Versuchen zum rationalen Design von Enzymen dokumentiert, wodurch computergestützte Designmethoden in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewinnen (Woycechowsky *et al.*, 2007; Toscano *et al.*, 2007). Beispielsweise gelang die Etablierung einer Esterhydrolyseaktivität auf dem Gerüst von Thioredoxin durch computerbasiertes Proteindesign (Bolon & Mayo, 2001). In jüngster Zeit wurde auf dem  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* Enzym TrpC erfolgreich eine nicht-natürlich vorkommende Retro-Aldolase Funktion etabliert (Jiang *et al.*, 2008), der mechanistisch eine allgemeine Säure-Base-Katalyse zugrunde liegt. Dabei lag die katalytische Effizienz des besten Computerdesigns mit  $0,06 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$  jedoch deutlich unter der natürlich vorkommender Enzyme. In einem kombinatorischen Ansatz aus Computerdesign und gerichteter Evolution wurde die bisher ebenfalls in der Natur nicht beobachtete Kemp Eliminierung, bei der ein Kohlenstoff durch eine allgemeine Base deprotoniert werden muss (Hu *et al.*, 2004), auf HisF etabliert (Röthlisberger *et al.*, 2008). Das beste Computerdesign zeigte eine katalytische Effizienz von  $0,73 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ , die durch eine Kombination aus Zufallsmutagenese und *Screening* um den Faktor 200 auf  $155,4 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$  verbessert werden konnte.

Das im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Enzymdesign basierte dagegen auf gerichteter Evolution. Durch gezielte Kombination von dabei gefundenen Austauschen konnten TrpF-aktive HisAF- und HisA-Varianten generiert werden, die in Hinblick auf ihre Michaelis-Menten-Konstanten bzw. Wechselzahlen wildtypische

Eigenschaften zeigen. Bislang sind keine Daten zur spontanen Umsatzrate des TrpF-Substrates PRA zu CdRP in wässriger Lösung bekannt. Die bisher geringste gemessene katalytische Effizienz für die TrpF-Reaktion liegt bei  $8 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  für die promiskuitive TrpF-Aktivität von PurF (Patrick & Matsumura, 2008). Bezieht man die in dieser Arbeit bestimmten katalytischen Effizienzen der aktivsten HisAF- und HisA-Variante auf diesen Wert, konnte für HisAF<sub>comIII</sub> bzw. HisAF<sub>comIII</sub> #5' eine Steigerung der katalytischen Effizienz um den Faktor  $1,8 \cdot 10^6$  bzw.  $3,2 \cdot 10^6$  und für HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V um den Faktor  $5,4 \cdot 10^6$  erzielt werden. Wie lassen sich diese Ergebnisse erklären? Bei der Beantwortung dieser Frage muss berücksichtigt werden, dass HisA und TrpF eine Amadori-Umlagerung durch eine allgemeine Säure-Base-Katalyse katalysieren (Abbildung 78).



**Abbildung 78: Durch HisA bzw. TrpF katalysierte Amadori-Umlagerung.**

Gemeinsamer Reaktionsmechanismus von TrpF und HisA. Asp8 aus HisA und Cys7 aus TrpF wirken vermutlich jeweils als allgemeine Base ( $B^-$ ); Asp127 aus HisA und Asp126 aus TrpF wirken vermutlich jeweils als allgemeine Säure ( $AH$ ). Aus Henn-Sax *et al.* (2002).

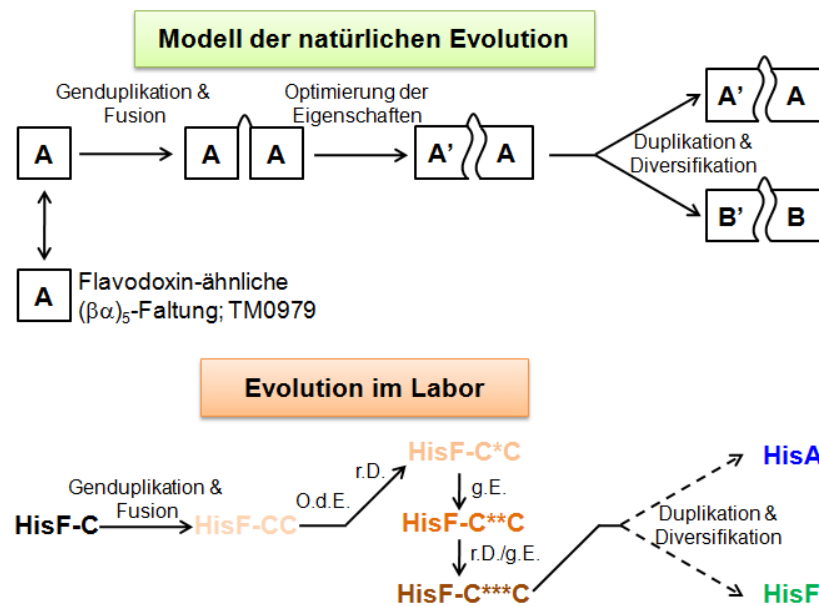
Die Ergebnisse früherer Arbeiten (Leopoldseder *et al.*, 2004) und dieser Dissertation deuten darauf hin, dass Asp8 sowohl bei der HisA-Reaktion (Henn-Sax *et al.*, 2002) als auch bei der TrpF-Reaktion der HisA- und HisAF-Varianten als allgemeine Base

wirkt. Bei der HisA-Reaktion fungiert Asp127 als allgemeine Säure. Dies kann für die TrpF-Reaktion auf HisA- und HisAF-Varianten ausgeschlossen werden, da dort an entsprechender Stelle ein Valin liegt (Abbildung 68 und Abbildung 77). Wright *et al.* (2008) spekulieren, dass die Säurefunktion bei den TrpF-aktiven HisA-Varianten durch die Carboxylatgruppe des Anthranilsäurerests von PRA bereitgestellt wird. Bis zur Verifikation dieser Hypothese können auch alternative Erklärungsmöglichkeiten in Betracht gezogen werden. So könnte etwa ein Wassermolekül den Furanosering protonieren. Die geplante Modellierung von PRA in das aktive Zentrum der Röntgenstruktur von HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V sollte hier mehr Klarheit schaffen.

Unabhängig davon zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass durch gerichtete Evolution *de novo* katalytische Effizienzen etabliert werden können, welche die momentanen Möglichkeiten des Computerdesigns deutlich übertreffen.

#### **5.4 Implikationen der gefundenen Ergebnisse für die Evolution der $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Faltung**

Bei der Untersuchung der Evolution der  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Struktur konnte – ausgehend von HisF-C – durch rationales Design und gerichtete Evolution das stabile, lösliche und aktive HisF-C\*\*\*C Protein hergestellt und seine Kristallstruktur gelöst werden (vgl. Kapitel 1.4; Höcker *et al.*, 2004; Seitz *et al.*, 2007; Lochner, 2008). Damit konnte das Modell der natürlichen Evolution von  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzymen ausgehend von  $(\beta\alpha)_4$ -Halbbarrel Proteinen erstmals im Labor nachvollzogen werden. Dabei fungiert HisF-C\*\*\*C als Modell für ein mögliches Vorläuferenzym, aus dem sich die heutigen  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyme HisA und HisF entwickelt haben (Abbildung 79).



**Abbildung 79: Schema der Evolution von ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>-Barrel Enzymen aus ( $\beta\alpha$ )<sub>4</sub>-Halbbarrel Proteinen durch Genduplikation und Genfusion.**

In der oberen Reihe ist das *Modell der natürlichen Evolution* von ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>-Barrel Enzymen ausgehend von ( $\beta\alpha$ )<sub>4</sub>-Halbbarrel Proteinen gezeigt. **A** steht für das ursprüngliche Halbbarrel, das im Laufe der Evolution zu **A'**, **B** und **B'** modifiziert wurde.

Dieses Modell konnte mittels *Evolution im Labor* durch die Duplikation, Fusion und anschließende Optimierung von HisF-C zu HisF-C\*\*\*C nachvollzogen werden, welches als Modell für den evolutionären Vorläufer von HisA und HisF steht.

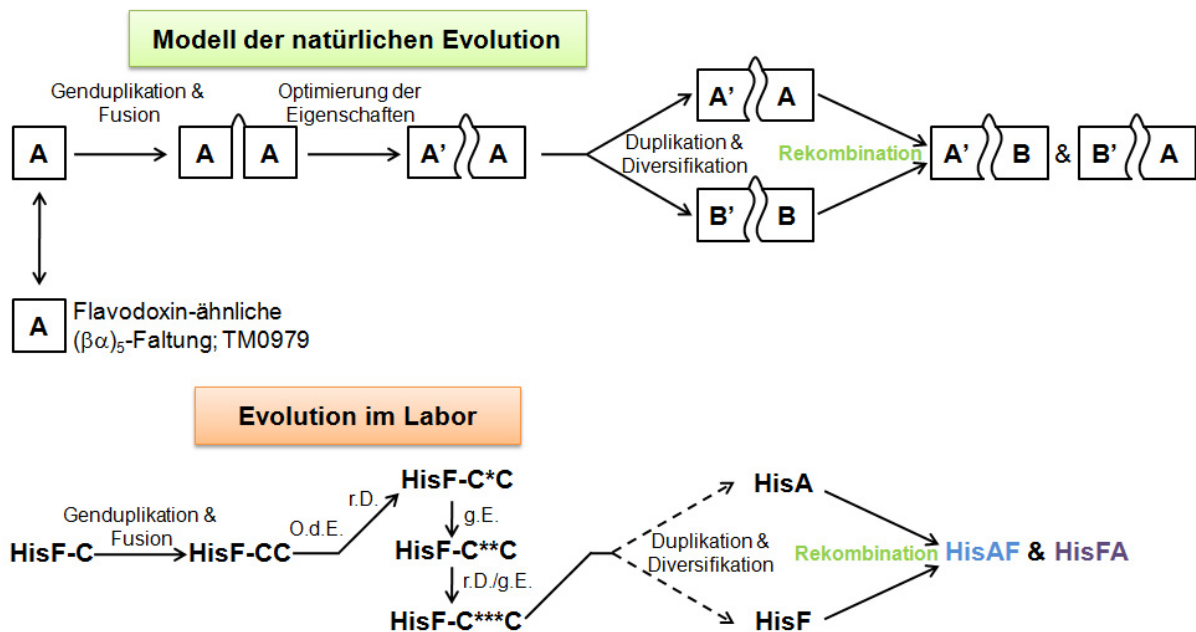
Abkürzungen: O.d.E.: Optimierung der Eigenschaften; r.D.: rationales Design; g.E.: gerichtete Evolution. Modifiziert nach Höcker *et al.* (2004).

Durch die Arbeiten mit HisF-C\*\*\*C konnte gezeigt werden, dass durch die Duplikation und Fusion vorhandener Module neue ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>-Barrel Proteine erzeugt werden können. Das Spektrum an kombinatorischen evolutionären Möglichkeiten wird deutlich erweitert, wenn man die mögliche Rekombination von Proteinmodulen betrachtet. So ist es erstmals gelungen, eine ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>-Barrel-ähnliche Struktur aus der C-terminalen Hälfte von HisF und einem ( $\beta\alpha$ )<sub>4</sub>-Fragment des zum ( $\beta\alpha$ )<sub>5</sub>-Flavodoxin-ähnlichen Faltungstypus gehörenden CheY zu rekonstruieren (Bharat *et al.*, 2008). Die resultierende Chimäre CheYHisF belegt, dass es während der Evolution von Proteinstrukturen prinzipiell möglich ist, durch Rekombination eine breitere Diversität zu erzielen. Allerdings wurde auf CheYHisF bisher keine katalytische Aktivität etabliert.

Im Rahmen dieser Dissertation sollte die Rekombination von ( $\beta\alpha$ )<sub>4</sub>-Halbbarrel Modulen mittels chimärer Proteine von HisA und HisF überprüft werden. In einer früheren Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Chimäre HisAF zu einem definierten und kompakten Protein faltet (Höcker *et al.*, 2004). In dieser Arbeit ist es erstmals gelungen, auf dieser artifiziellen ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>-Barrel Chimäre eine

katalytische Aktivität zu etablieren, die in Hinblick auf die Bindung von Liganden wildtypische Eigenschaften zeigt.

Auf der Basis der Ergebnisse dieser Arbeit, kann das postulierte Modell der natürlichen Evolution für die  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* Struktur nunmehr um die Rekombination von  $(\beta\alpha)_4$ -Halb*barrel* Proteinen erweitert werden (Abbildung 80).



**Abbildung 80: Schema der Evolution von  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* Enzymen aus  $(\beta\alpha)_4$  Halb*barrel* Proteinen durch Genduplikation, Fusion, Diversifikation und Rekombination.**

In der oberen Reihe ist das *Modell der natürlichen Evolution* von  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* Enzymen ausgehend von  $(\beta\alpha)_4$ -Halb*barrel* Proteinen gezeigt. **A** steht für das ursprüngliche Halb*barrel*, das im Laufe der Evolution zu **A'**, **B** und **B'** modifiziert wurde. Unterstützt wird dieses Modell durch den Fund heutiger Proteinfaltungen, die der postulierten  $(\beta\alpha)_4$  Halb*barrel*faltung ähnlich sind (Flavodoxin-ähnliche  $(\beta\alpha)_5$ -Faltung, TM0979). In einem weiteren Schritt wäre denkbar, dass es zur Rekombination einzelner  $(\beta\alpha)_4$ -Halb*barrel* Module und somit zu einer größeren erschließbaren Diversität gekommen ist. Dies wird für die pro- und eukaryotischen PI-PLC angenommen (Heinz *et al.*, 1998).

Dieses Modell konnte mittels *Evolution im Labor* durch die Duplikation, Fusion und anschließende Optimierung von HisF-C zu HisF-C\*\*\*C nachvollzogen werden. Somit fungiert HisF-C\*\*\*C als Modell für ein  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* Enzym, von dem sich die heutigen spezialisierten  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* Enzyme wie HisA oder HisF entwickelt haben könnten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die postulierte Rekombination von  $(\beta\alpha)_4$ -Halb*barrel* Modulen anhand des chimären Enzyms HisAF erfolgreich belegt werden.

Abkürzungen: O.d.E.: Optimierung der Eigenschaften; r.D.: rationales Design; g.E.: gerichtete Evolution. Modifiziert nach Höcker *et al.* (2004).



## 5.5 Ausblick

### HisAF

Trotz zahlreicher Versuche ist es bisher nicht gelungen, eine hoch aufgelöste Röntgenstruktur von HisAF bzw. stabilisierter oder TrpF-aktiver HisAF-Varianten zu erhalten. Möglicherweise muss dazu die Stabilität des Proteins noch weiter gesteigert werden. Hier würde sich anbieten, HisAF-D8V+Y140H+F226E mit weiteren stabilisierenden Mutationen, die aus der pTNA-*hisAFcomIII*- und evtl. der pTNA-*hisAFcomII\_loop5*-NNS-Genbank isoliert wurden, zu kombinieren. Auch wenn mit Hilfe der Struktur von HisAF mit einer Auflösung von 4 Å eindeutig gezeigt werden konnte, dass das Protein ein  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* bildet, würde eine hoch aufgelöste Struktur dennoch wertvolle Informationen liefern. So ist es möglich, dass die Etablierung von HisA- und HisF-Aktivität auf HisAF durch evolutionäre Methoden nicht zugänglich ist, jedoch durch rationales Design gelingen könnte. Um die TrpF-Aktivität von HisAF*comIII* noch weiter zu steigern, würde sich das von Neuenschwander *et al.* (2007) entwickelte Selektionssystem, bestehend aus regulierbarem Transkriptionslevel mittels induzierbarem Promotor und proteolytischem Abbau, anbieten.

Nachdem im *yeast-2-hybrid* Test Hinweise gewonnen werden, dass Varianten von HisAF *in vivo* einen Komplex mit HisH bildeten, bieten sich hier weitere Optimierungen in Hinblick auf Löslichkeit und Stabilität an, um diese Konstrukte ebenfalls *in vitro* charakterisieren zu können.

### HisFA

Die Untersuchung der Chimäre HisFA ist im Rahmen dieser Arbeit in den Hintergrund gerückt. Dennoch wäre es naheliegend, HisFA an MBP zu fusionieren und für die TrpF-Aktivität von HisAF essenziellen Reste an analoger Stelle in HisFA einzubauen. In einem ersten Schritt könnte in einem  $\Delta trpF$ -Stamm überprüft werden, ob dieses Konstrukt ebenfalls TrpF-Aktivität *in vivo* zeigt. Wenn das der Fall ist, könnte man durch gerichtete Evolution weitere Mutationen identifizieren, die zu einer Stabilisierung und Verbesserung der Löslichkeit beitragen.

### HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V

Bisher ist die hohe TrpF-Fremdaktivität von HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V nicht erklärbar. Relativ sicher erscheint aufgrund der Ergebnisse dieser und früherer

Arbeiten, dass Asp8 als allgemeine Base wirkt. Welche Aminosäure als allgemeine Säure fungiert, ist jedoch unklar. Hier sollte die Modellierung von PRA in das aktive Zentrum der hoch aufgelösten in nächster Zeit Klarheit bringen.

Bisher zeigten die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten HisA-Varianten den vollständigen Verlust der HisA-Aktivität. Abgeleitet von dem HisA-homologen Enzym PriA wäre es interessant einen *E. coli*  $\Delta hisA\Delta trpF$ -Doppeldeletionsstamm herzustellen und diesen zur Selektion auf ein bifunktionelles HisA-Derivat zu nutzen. Somit könnte überprüft werden, ob die TrpF-Aktivität auch unter Erhalt der Reste His75, Phe111, Asp127 und Asp169 und somit unter Beibehaltung der HisA-Aktivität auf HisA etabliert werden kann.

## 6 Literaturverzeichnis

---

**Abelson, J. N., C. Guthrie and G. R. Fink** (2003). "Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology. Methods in Enzymology." Academic Press Inc.

**Aharoni, A., A. D. Griffiths and D. S. Tawfik** (2005). "High-throughput screens and selections of enzyme-encoding genes." Curr Opin Chem Biol **9**(2): 210-6.

**Anantharaman, V., L. Aravind and E. V. Koonin** (2003). "Emergence of diverse biochemical activities in evolutionarily conserved structural scaffolds of proteins." Curr Opin Chem Biol **7**(1): 12-20.

**Arnold, F. H.** (2001). "Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design." Nature **409**(6817): 253-7.

**Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner and H. Mori** (2006). "Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection." Mol Syst Biol **2**: 2006 0008.

**Banner, D. W., A. C. Bloomer, G. A. Petsko, D. C. Phillips, C. I. Pogson, I. A. Wilson, P. H. Corran, A. J. Furth, J. D. Milman, R. E. Offord, J. D. Priddle and S. G. Waley** (1975). "Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data." Nature **255**(5510): 609-14.

**Barona-Gomez, F. and D. A. Hodgson** (2003). "Occurrence of a putative ancient-like isomerase involved in histidine and tryptophan biosynthesis." EMBO Rep **4**(3): 296-300.

**Bartel, P. L., C. T. Chien, R. Sternglanz and S. Fields** (1993). "Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions." D.A. Hartley (ed.), Cellular Interactions in Development: A practical approach. Oxford University Press, Oxford, 153-179.

**Bashton, M. and C. Chothia** (2007). "The generation of new protein functions by the combination of domains." Structure **15**(1): 85-99.

**Beckman, R. A., A. S. Mildvan and L. A. Loeb** (1985). "On the fidelity of DNA replication: manganese mutagenesis in vitro." Biochemistry **24**(21): 5810-7.

**Beismann-Driemeyer, S. and R. Sterner** (2001). "Imidazole glycerol phosphate synthase from *Thermotoga maritima*. Quaternary structure, steady-state kinetics, and reaction mechanism of the bienzyme complex." J Biol Chem **276**(23): 20387-96.

**Bertolaet, B. L. and J. R. Knowles** (1995). "Complementation of fragments of triosephosphate isomerase defined by exon boundaries." Biochemistry **34**(17): 5736-43.

**Bharat, T. A. M., S. Eisenbeis, K. Zeth and B. Höcker** (2008). "A  $\beta\alpha$ -barrel built by the combination of fragments from different folds." Proc Natl Acad Sci U S A **x**(x): x-x. im Druck.

**Bisswanger, H., K. Kirschner, W. Cohn, V. Hager and E. Hansson** (1979). "N-(5-Phosphoribosyl)anthranilate isomerase-indoleglycerol-phosphate synthase. 1. A substrate analogue binds to two different binding sites on the bifunctional enzyme from *Escherichia coli*." Biochemistry **18**(26): 5946-53.

**Boersma, Y. L., M. J. Droge and W. J. Quax** (2007). "Selection strategies for improved biocatalysts." Febs J **274**(9): 2181-95.

**Bolon, D. N. and S. L. Mayo** (2001). "Enzyme-like proteins by computational design." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(25): 14274-9.

- Bornscheuer, U. T. and M. Pohl** (2001). "Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design." Curr Opin Chem Biol **5**(2): 137-43.
- Brent, R. and M. Ptashne** (1985). "A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor." Cell **43**(3 Pt 2): 729-36.
- Brilli, M. and R. Fani** (2004). "The origin and evolution of eucaryal HIS7 genes: from metabolon to bifunctional proteins?" Gene **339**: 149-60.
- Bujard, H., R. Gentz, M. Lanzer, D. Stueber, M. Mueller, I. Ibrahimi, M. T. Haeuptle and B. Dobberstein** (1987). "A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins in vitro and in vivo." Methods Enzymol **155**: 416-33.
- Cadwell, R. C. and G. F. Joyce** (1994). "Mutagenic PCR." PCR Methods Appl **3**(6): S136-40.
- Caetano-Anolles, G., H. S. Kim and J. E. Mittenthal** (2007). "The origin of modern metabolic networks inferred from phylogenomic analysis of protein architecture." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(22): 9358-63.
- Cedrone, F., A. Menez and E. Quemeneur** (2000). "Tailoring new enzyme functions by rational redesign." Curr Opin Struct Biol **10**(4): 405-10.
- Certa, U., W. Bannwarth, D. Stuber, R. Gentz, M. Lanzer, S. Le Grice, F. Guillot, I. Wendler, G. Hunsmann, H. Bujard and et al.** (1986). "Subregions of a conserved part of the HIV gp41 transmembrane protein are differentially recognized by antibodies of infected individuals." Embo J **5**(11): 3051-6.
- Chen, R.** (2001). "Enzyme engineering: rational redesign versus directed evolution." Trends Biotechnol **19**(1): 13-4.
- Chester, N. and D. R. Marshak** (1993). "Dimethyl sulfoxide-mediated primer T<sub>m</sub> reduction: a method for analyzing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction." Anal Biochem **209**(2): 284-90.
- Chothia, C., J. Gough, C. Vogel and S. A. Teichmann** (2003). "Evolution of the protein repertoire." Science **300**(5626): 1701-3.
- Claren, J.** (2003). "Etablierung einer neuen katalytischen Aktivität im (βα)<sub>8</sub>-Barrel Enzym Imidazolglycerinphosphat-Synthase (HisF) durch Proteindesign." Diplomarbeit, Universität Köln.
- Cline, J., J. C. Braman and H. H. Hogrefe** (1996). "PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases." Nucleic Acids Res **24**(18): 3546-51.
- Cooper, G. M.** (2000). "The Cell - A Molecular Approach; Chapter 10: The Chloroplast Genome " published by Sinauer Associates, Inc.
- Copley, S. D.** (2003). "Enzymes with extra talents: moonlighting functions and catalytic promiscuity." Curr Opin Chem Biol **7**(2): 265-72.
- Coulson, A. F. and J. Moulton** (2002). "A unfold, mesofold, and superfold model of protein fold use." Proteins **46**(1): 61-71.
- Counago, R., S. Chen and Y. Shamoo** (2006). "In vivo molecular evolution reveals biophysical origins of organismal fitness." Mol Cell **22**(4): 441-9.
- Darimont, B., C. Stehlin, H. Szadkowski and K. Kirschner** (1998). "Mutational analysis of the active site of indoleglycerol phosphate synthase from Escherichia coli." Protein Sci **7**(5): 1221-32.
- Darwin, C.** (1859). "On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life." London: John Murray.

- Datsenko, K. A. and B. L. Wanner** (2000). "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6640-5.
- Davisson, V. J., I. L. Deras, S. E. Hamilton and L. L. Moore** (1994). "A plasmid-based approach for the synthesis of a histidine biosynthetic intermediate." J Org Chem **59**: 137-143.
- di Guan, C., P. Li, P. D. Riggs and H. Inouye** (1988). "Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein." Gene **67**(1): 21-30.
- Douangamath, A., M. Walker, S. Beismann-Driemeyer, M. C. Vega-Fernandez, R. Sterner and M. Wilmanns** (2002). "Structural evidence for ammonia tunneling across the (beta alpha)<sub>8</sub> barrel of the imidazole glycerol phosphate synthase bienzyme complex." Structure **10**(2): 185-93.
- Dower, W. J., J. F. Miller and C. W. Ragsdale** (1988). "High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation." Nucleic Acids Res **16**(13): 6127-45.
- Drummond, D. A., B. L. Iverson, G. Georgiou and F. H. Arnold** (2005). "Why high-error-rate random mutagenesis libraries are enriched in functional and improved proteins." J Mol Biol **350**(4): 806-16.
- Dumm, B.** (2006). "Optimierung der Fremdaktivität eines (β $\alpha$ )<sub>8</sub>-Barrel Enzyms aus der Histidinbiosynthese." Diplomarbeit, Universität Regensburg.
- Eckert, K. A. and T. A. Kunkel** (1990). "High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase." Nucleic Acids Res **18**(13): 3739-44.
- Edman, P. and G. Begg** (1967). "A protein sequenator." Eur J Biochem **1**(1): 80-91.
- Erickson, H. P.** (1989). "Co-operativity in protein-protein association. The structure and stability of the actin filament." J Mol Biol **206**(3): 465-74.
- Fani, R., M. Brilli, M. Fondi and P. Lio** (2007). "The role of gene fusions in the evolution of metabolic pathways: the histidine biosynthesis case." BMC Evol Biol **7 Suppl 2**: S4.
- Fani, R., P. Lio, I. Chiarelli and M. Bazzicalupo** (1994). "The evolution of the histidine biosynthetic genes in prokaryotes: a common ancestor for the *hisA* and *hisF* genes." J Mol Evol **38**(5): 489-95.
- Fani, R., E. Mori, E. Tamburini and A. Lazcano** (1998). "Evolution of the structure and chromosomal distribution of histidine biosynthetic genes." Orig Life Evol Biosph **28**(4-6): 555-70.
- Farber, G. K. and G. A. Petsko** (1990). "The evolution of alpha/beta barrel enzymes." Trends Biochem Sci **15**(6): 228-34.
- Fields, S. and O. Song** (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions." Nature **340**(6230): 245-6.
- Fox, J. D. and D. S. Waugh** (2003). "Maltose-Binding Protein as a Solubility Enhancer." E. coli Gene Expression Protocols: 99-117.
- Fromant, M., S. Blanquet and P. Plateau** (1995). "Direct random mutagenesis of gene-sized DNA fragments using polymerase chain reaction." Anal Biochem **224**(1): 347-53.
- Gaspar, J. A., C. Liu, K. A. Vassall, G. Meglei, R. Stephen, P. B. Stathopoulos, A. Pineda-Lucena, B. Wu, A. Yee, C. H. Arrowsmith and E. M. Meiering** (2005). "A novel member of the YchN-like fold: solution structure of the hypothetical protein Tm0979 from *Thermotoga maritima*." Protein Sci **14**(1): 216-23.
- Gerlt, J. A., P. C. Babbitt and I. Rayment** (2005). "Divergent evolution in the enolase superfamily: the interplay of mechanism and specificity." Arch Biochem Biophys **433**(1): 59-70.

- Goldschmidt, E. P., M. S. Cater, T. S. Matney, M. A. Butler and A. Greene** (1970). "Genetic analysis of the histidine operon in *Escherichia coli* K12." Genetics **66**(2): 219-29.
- Goraj, K., A. Renard and J. A. Martial** (1990). "Synthesis, purification and initial structural characterization of octarellin, a de novo polypeptide modelled on the alpha/beta-barrel proteins." Protein Eng **3**(4): 259-66.
- Govindarajan, S., R. Recabarren and R. A. Goldstein** (1999). "Estimating the total number of protein folds." Proteins **35**(4): 408-14.
- Grishin, N. V.** (2001). "Fold change in evolution of protein structures." J Struct Biol **134**(2-3): 167-85.
- Häger, M.** (2005). "Evolution und Regulation von Protein-Protein-Interaktionen in zwei Glutamin-Amidotransferase aus der Biosynthese von Histidin und Tryptophan." Dissertation, Universität Regensburg.
- Hanahan, D.** (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-80.
- Harper, J. W., G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi and S. J. Elledge** (1993). "The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases." Cell **75**(4): 805-16.
- Hart, D. J. and F. Tarendeau** (2006). "Combinatorial library approaches for improving soluble protein expression in *Escherichia coli*." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **62**(Pt 1): 19-26.
- Heinz, D. W., L. O. Essen and R. L. Williams** (1998). "Structural and mechanistic comparison of prokaryotic and eukaryotic phosphoinositide-specific phospholipases C." J Mol Biol **275**(4): 635-50.
- Henn-Sax, M.** (2001). "Evolution und katalytischer Mechanismus eines thermostabilen ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>-Barrel-Enzyms aus der Histidinbiosynthese." Dissertation, Universität Köln.
- Henn-Sax, M., B. Hocker, M. Wilmanns and R. Sterner** (2001). "Divergent evolution of (betaalpha)<sub>8</sub>-barrel enzymes." Biol Chem **382**(9): 1315-20.
- Henn-Sax, M., R. Thoma, S. Schmidt, M. Hennig, K. Kirschner and R. Sterner** (2002). "Two (betaalpha)<sub>8</sub>-barrel enzymes of histidine and tryptophan biosynthesis have similar reaction mechanisms and common strategies for protecting their labile substrates." Biochemistry **41**(40): 12032-42.
- Hennig, M., B. D. Darimont, J. N. Jansonius and K. Kirschner** (2002). "The catalytic mechanism of indole-3-glycerol phosphate synthase: crystal structures of complexes of the enzyme from *Sulfolobus solfataricus* with substrate analogue, substrate, and product." J Mol Biol **319**(3): 757-66.
- Hennig, M., J. N. Jansonius, A. C. Terwisscha van Scheltinga, B. W. Dijkstra and B. Schlesier** (1995). "Crystal structure of concanavalin B at 1.65 Å resolution. An "inactivated" chitinase from seeds of *Canavalia ensiformis*." J Mol Biol **254**(2): 237-46.
- Hennig, M., S. Pfeffer-Hennig, Z. Dauter, K. S. Wilson, B. Schlesier and V. H. Nong** (1995). "Crystal structure of narbonin at 1.8 Å resolution." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **51**(Pt 2): 177-89.
- Hennig, M., B. Schlesier, Z. Dauter, S. Pfeffer, C. Betzel, W. E. Hohne and K. S. Wilson** (1992). "A TIM barrel protein without enzymatic activity? Crystal-structure of narbonin at 1.8 Å resolution." FEBS Lett **306**(1): 80-4.
- Ho, S. N., H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen and L. R. Pease** (1989). "Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction." Gene **77**(1): 51-9.
- Höcker, B.** (2002). "Experimentelle Rekonstruktion der Evolution von Proteinen am Beispiel zweier ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>-Barrel Enzyme aus der Histidinbiosynthese." Dissertation, Universität zu Köln.

- Höcker, B., S. Beismann-Driemeyer, S. Hettwer, A. Lustig and R. Sterner** (2001). "Dissection of a (betaalpha)8-barrel enzyme into two folded halves." *Nat Struct Biol* **8**(1): 32-6.
- Höcker, B., J. Claren and R. Sterner** (2004). "Mimicking enzyme evolution by generating new (betaalpha)8-barrels from (betaalpha)4-half-barrels." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(47): 16448-53.
- Höcker, B., C. Jurgens, M. Wilmanns and R. Sterner** (2001). "Stability, catalytic versatility and evolution of the (beta alpha)(8)-barrel fold." *Curr Opin Biotechnol* **12**(4): 376-81.
- Höcker, B., S. Schmidt and R. Sterner** (2002). "A common evolutionary origin of two elementary enzyme folds." *FEBS Lett* **510**(3): 133-5.
- Hommel, U., M. Eberhard and K. Kirschner** (1995). "Phosphoribosyl anthranilate isomerase catalyzes a reversible amadori reaction." *Biochemistry* **34**(16): 5429-39.
- Hope, I. A. and K. Struhl** (1986). "Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast." *Cell* **46**(6): 885-94.
- Horovitz, A., L. Serrano, B. Avron, M. Bycroft and A. R. Fersht** (1990). "Strength and co-operativity of contributions of surface salt bridges to protein stability." *J Mol Biol* **216**(4): 1031-44.
- Hu, Y., K. N. Houk, K. Kikuchi, K. Hotta and D. Hilvert** (2004). "Nonspecific Medium Effects versus Specific Group Positioning in the Antibody and Albumin Catalysis of the Base-Promoted Ring-Opening Reactions of Benzisoxazoles." *J. Am. Chem. Soc.* **126**(26): 8197-8205.
- Huang, J., A. Koide, K. Makabe and S. Koide** (2008). "Design of protein function leaps by directed domain interface evolution." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(18): 6578-83.
- Huang, W. and D. V. Santi** (1994). "Identification of biologically active mutants by combinatorial cassette mutagenesis: exclusion of wild-type codon from degenerate codons." *Anal Biochem* **218**(2): 454-7.
- Huynen, M. A. and P. Bork** (1998). "Measuring genome evolution." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(11): 5849-56.
- Inoue, H., H. Nojima and H. Okayama** (1990). "High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids." *Gene* **96**(1): 23-8.
- Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata and A. Kimura** (1983). "Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations." *J Bacteriol* **153**(1): 163-8.
- Jain, R., M. C. Rivera, J. E. Moore and J. A. Lake** (2002). "Horizontal gene transfer in microbial genome evolution." *Theor Popul Biol* **61**(4): 489-95.
- Jain, R., M. C. Rivera, J. E. Moore and J. A. Lake** (2003). "Horizontal gene transfer accelerates genome innovation and evolution." *Mol Biol Evol* **20**(10): 1598-602.
- James, L. C. and D. S. Tawfik** (2003). "Conformational diversity and protein evolution--a 60-year-old hypothesis revisited." *Trends Biochem Sci* **28**(7): 361-8.
- James, P., J. Halladay and E. A. Craig** (1996). "Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast." *Genetics* **144**(4): 1425-36.
- Jawad, Z. and M. Paoli** (2002). "Novel sequences propel familiar folds." *Structure* **10**(4): 447-54.
- Jensen, R. A.** (1976). "Enzyme recruitment in evolution of new function." *Annu Rev Microbiol* **30**: 409-25.
- Jensen, R. A.** (1987). "Evolution of metabolic pathways in enteric bacteria." *In: Escherichia coli and Samonella typhimurium: cellular and molecular biology; Volume 1; Edited by: Neidhardt F.C., Ingraham J.L., Low K.B., Magasanik B., Schaechter M., Humbarger H.D. Washington D.C: ASM Press; pp: 2649-2662.*

Jiang, L., E. A. Althoff, F. R. Clemente, L. Doyle, D. Rothlisberger, A. Zanghellini, J. L. Gallaheer, J. L. Betker, F. Tanaka, C. F. Barbas, 3rd, D. Hilvert, K. N. Houk, B. L. Stoddard and D. Baker (2008). "De novo computational design of retro-aldol enzymes." *Science* **319**(5868): 1387-91.

Johnson, W. C., Jr. (1990). "Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide." *Proteins* **7**(3): 205-14.

Jürgens, C. (2000). "Änderung des Substratspektrums der 5'-ProFAR-Isomerase aus *Thermotoga maritima* durch gerichtete Evolution." *Diplomarbeit, Universität Göttingen*.

Jürgens, C., A. Strom, D. Wegener, S. Hettwer, M. Wilmanns and R. Sterner (2000). "Directed evolution of a (beta alpha)8-barrel enzyme to catalyze related reactions in two different metabolic pathways." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(18): 9925-30.

Kapust, R. B. and D. S. Waugh (1999). "Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused." *Protein Sci* **8**(8): 1668-74.

Kirk, O., T. V. Borchert and C. C. Fuglsang (2002). "Industrial enzyme applications." *Curr Opin Biotechnol* **13**(4): 345-51.

Kleemann, G. (1995). "Characterization of an equilibrium folding intermediate of an eightfold ( $\beta\alpha$ )-barrel protein (Evidence for a three-state folding mechanism)." *Dissertation, Universität Basel*.

Klem, T. J. and V. J. Davisson (1993). "Imidazole glycerol phosphate synthase: the glutamine amidotransferase in histidine biosynthesis." *Biochemistry* **32**(19): 5177-86.

Knowles, J. R. (1991). "To build an enzyme." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **332**(1263): 115-21.

Koonin, E. V., Y. I. Wolf and G. P. Karev (2002). "The structure of the protein universe and genome evolution." *Nature* **420**(6912): 218-223.

Kuper, J., C. Doenges and M. Wilmanns (2005). "Two-fold repeated (betaalpha)4 half-barrels may provide a molecular tool for dual substrate specificity." *EMBO Rep* **6**(2): 134-9.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.

Lang, D., R. Thoma, M. Henn-Sax, R. Sterner and M. Wilmanns (2000). "Structural evidence for evolution of the beta/alpha barrel scaffold by gene duplication and fusion." *Science* **289**(5484): 1546-50.

Lazcano, A. and S. L. Miller (1996). "The origin and early evolution of life: prebiotic chemistry, the pre-RNA world, and time." *Cell* **85**(6): 793-8.

Lazcano, A. and S. L. Miller (1999). "On the origin of metabolic pathways." *J Mol Evol* **49**(4): 424-31.

Le Gouill, C., J. L. Parent, R. P. M. and S. J. (1994). "Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method." *Anal Biochem* **219**(1): 164.

Leopoldseder, S. (2002). "Molekulare Analyse einer Substratspezifitätsänderung der 5'-ProFAR Isomerase aus *Thermotoga maritima*." *Diplomarbeit, Universität Köln*.

Leopoldseder, S., J. Claren, C. Jurgens and R. Sterner (2004). "Interconverting the catalytic activities of (betaalpha)(8)-barrel enzymes from different metabolic pathways: sequence requirements and molecular analysis." *J Mol Biol* **337**(4): 871-9.

Leung, D., E. Chen and D. Goeddel (1989). "A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction." *Technique* **1**: 11-15.

Littlechild, J. A., J. Guy, S. Connelly, L. Mallett, S. Waddell, C. A. Rye, K. Line and M. Isupov (2007). "Natural methods of protein stabilization: thermostable biocatalysts." *Biochemical Society Transactions* **035**(6): 1558-1563.



**Lochner, A.** (2008). "Stabilisierung und Aktivierung eines künstlichen  $(\beta\alpha)_8$  Fass Proteins." Diplomarbeit, Universität Regensburg.

**Lupas, A. N., C. P. Ponting and R. B. Russell** (2001). "On the evolution of protein folds: are similar motifs in different protein folds the result of convergence, insertion, or relics of an ancient peptide world?" J Struct Biol **134**(2-3): 191-203.

**Lutz, S. and S. J. Benkovic** (2002). "Engineering Protein Evolution." *In: Directed Molecular Evolution of Proteins*. Edited by: Brahmans S. & Johnson K., Wiley VCH Weinheim, chapter 9, pp. 177-213.

**Lynch, M. and J. S. Conery** (2000). "The evolutionary fate and consequences of duplicate genes." Science **290**(5494): 1151-5.

**Lyu, P. C., P. J. Gans and N. R. Kallenbach** (1992). "Energetic contribution of solvent-exposed ion pairs to alpha-helix structure." J Mol Biol **223**(1): 343-50.

**Marcotte, E. M., M. Pellegrini, H. L. Ng, D. W. Rice, T. O. Yeates and D. Eisenberg** (1999). "Detecting protein function and protein-protein interactions from genome sequences." Science **285**(5428): 751-3.

**Margolies, M. N. and R. F. Goldberger** (1966). "Isolation of the fourth (isomerase) of histidine biosynthesis from Salmonella typhimurium." J Biol Chem **241**(14): 3262-9.

**Matney, T. S., E. P. Goldschmidt, N. S. Erwin and R. A. Scroggs** (1964). "A preliminary map of genomic sites for F-attachment in Escherichia coli K12." Biochem Biophys Res Commun **17**(3): 278-81.

**Maxwell, K. L., A. K. Mittermaier, J. D. Forman-Kay and A. R. Davidson** (1999). "A simple in vivo assay for increased protein solubility." Protein Sci **8**(9): 1908-11.

**Mayr, E.** (2003). "Das ist Evolution." C. Bertelsmann.

**Merz, A., M. C. Yee, H. Szadkowski, G. Pappenberger, A. Cramer, W. P. Stemmer, C. Yanofsky and K. Kirschner** (2000). "Improving the catalytic activity of a thermophilic enzyme at low temperatures." Biochemistry **39**(5): 880-9.

**Mullis, K. B. and F. A. Faloona** (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol **155**: 335-50.

**Murzin, A. G., S. E. Brenner, T. Hubbard and C. Chothia** (1995). "SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures." J Mol Biol **247**(4): 536-40.

**Nagano, N., C. A. Orengo and J. M. Thornton** (2002). "One fold with many functions: the evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions." J Mol Biol **321**(5): 741-65.

**Nagatani, R. A., A. Gonzalez, B. K. Shoichet, L. S. Brinen and P. C. Babbitt** (2007). "Stability for function trade-offs in the enolase superfamily "catalytic module"." Biochemistry **46**(23): 6688-95.

**Nagi, A. D. and L. Regan** (1997). "An inverse correlation between loop length and stability in a four-helix-bundle protein." Fold Des **2**(1): 67-75.

**Neuenschwander, M., M. Butz, C. Heintz, P. Kast and D. Hilvert** (2007). "A simple selection strategy for evolving highly efficient enzymes." Nat Biotechnol **25**(10): 1145-7.

**Nikkhah, M., Z. Jawad-Alami, M. Demydchuk, D. Ribbons and M. Paoli** (2006). "Engineering of beta-propeller protein scaffolds by multiple gene duplication and fusion of an idealized WD repeat." Biomol Eng **23**(4): 185-94.

**Nisbet, E. G. and N. H. Sleep** (2001). "The habitat and nature of early life." Nature **409**(6823): 1083-91.

**O'Brien, P. J. and D. Herschlag** (1999). "Catalytic promiscuity and the evolution of new enzymatic activities." Chem Biol **6**(4): R91-R105.

**Ochman, H., J. G. Lawrence and E. A. Groisman** (2000). "Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation." Nature **405**(6784): 299-304.

**Orengo, C. A., D. T. Jones and J. M. Thornton** (1994). "Protein superfamilies and domain superfolds." Nature **372**(6507): 631-4.

**Osborn, H. F.** (1905). "From the Greeks to Darwin: An Outline of the Development of the Evolution Idea." Macmillan and Co.

**Ostermeier, M., J. H. Shim and S. J. Benkovic** (1999). "A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology." Nat Biotechnol **17**(12): 1205-9.

**Pace, C. N.** (1990). "Conformational stability of globular proteins." Trends Biochem Sci **15**(1): 14-7.

**Pace, C. N. and J. M. Scholtz** (1997). "Measuring the conformational stability of a protein. ." In: Proofs for Protein Structure: A practical approach. Chapter 12, pp 299-321, Creighton T.E., IRL Press, Oxford, 2ed.

**Pace, C. N., F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley and T. Gray** (1995). "How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein." Protein Sci **4**(11): 2411-23.

**Pan, H., A. S. Raza and D. L. Smith** (2004). "Equilibrium and kinetic folding of rabbit muscle triosephosphate isomerase by hydrogen exchange mass spectrometry." J Mol Biol **336**(5): 1251-63.

**Patrick, W. M. and I. Matsumura** (2008). "A study in molecular contingency: glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase is a promiscuous and evolvable phosphoribosylanthranilate isomerase." J Mol Biol **377**(2): 323-36.

**Patterson, G. H., S. M. Knobel, W. D. Sharif, S. R. Kain and D. W. Piston** (1997). "Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy." Biophys J **73**(5): 2782-90.

**Payandeh, J. and E. F. Pai** (2007). "Enzyme-driven speciation: crystallizing Archaea via lipid capture." J Mol Evol **64**(3): 364-74.

**Pedelacq, J. D., E. Piltch, E. C. Liong, J. Berendzen, C. Y. Kim, B. S. Rho, M. S. Park, T. C. Terwilliger and G. S. Waldo** (2002). "Engineering soluble proteins for structural genomics." Nat Biotechnol **20**(9): 927-32.

**Phillips, D. C., M. J. Sternberg, J. M. Thornton and I. A. Wilson** (1978). "An analysis of the structure of triose phosphate isomerase and its comparison with lactate dehydrogenase." J Mol Biol **119**(2): 329-51.

**Ponstingl, H., T. Kabir, D. Gorse and J. M. Thornton** (2005). "Morphological aspects of oligomeric protein structures." Prog Biophys Mol Biol **89**(1): 9-35.

**Poo, H., J. J. Song, S.-P. Hong, Y.-H. Choi, S. W. Yun, J.-H. Kim, S. C. Lee, S.-G. Lee and M. H. Sung** (2002). "Novel high-level constitutive expression system, pHCE vector, for a convenient and cost-effective soluble production of human tumor necrosis factor- $\alpha$ ." Biotechnology Letters **24**(14): 1185-1189.

**Quevillon-Cheruel, S., N. Leulliot, M. Graille, K. Blondeau, J. Janin and H. van Tilbeurgh** (2006). "Crystal structure of the yeast His6 enzyme suggests a reaction mechanism." Protein Sci **15**(6): 1516-21.

**Radzicka, A. and R. Wolfenden** (1995). "A proficient enzyme." Science **267**(5194): 90-3.

**Ramsden, W.** (1902). "Some new properties of urea." J Physiol **28**: xxiii-xxvii.

- Reeves, T. E., M. E. Wales, J. K. Grimsley, P. Li, D. M. Cerasoli and J. R. Wild** (2008). "Balancing the stability and the catalytic specificities of OP hydrolases with enhanced V-agent activities." Protein Eng Des Sel **21**(6): 405-12.
- Riechmann, L. and G. Winter** (2006). "Early protein evolution: building domains from ligand-binding polypeptide segments." J Mol Biol **363**(2): 460-8.
- Ro, D. K., E. M. Paradise, M. Ouellet, K. J. Fisher, K. L. Newman, J. M. Ndungu, K. A. Ho, R. A. Eachus, T. S. Ham, J. Kirby, M. C. Chang, S. T. Withers, Y. Shiba, R. Sarpong and J. D. Keasling** (2006). "Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast." Nature **440**(7086): 940-3.
- Robben, J., G. Massie, E. Bosmans, B. Wellens and G. Volckaert** (1993). "An Escherichia coli plasmid vector system for high-level production and purification of heterologous peptides fused to active chloramphenicol acetyltransferase." Gene **126**(1): 109-13.
- Röthlisberger, D., O. Khersonsky, A. M. Wollacott, L. Jiang, J. DeChancie, J. Betker, J. L. Gallaher, E. A. Althoff, A. Zanghellini, O. Dym, S. Albeck, K. N. Houk, D. S. Tawfik and D. Baker** (2008). "Kemp elimination catalysts by computational enzyme design." Nature **453**(7192): 190-5.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich** (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-91.
- Sambrook, J., E. E. Fritsch and T. Maniatis** (1989). "Molecular cloning: a laboratory manual." New York, Cold Spring Harbour.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson** (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
- Sarkar, G. and S. S. Sommer** (1990). "The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis." Biotechniques **8**(4): 404-7.
- Schäfer, T., T. W. Borchert, V. Nielsen, P. Skagerlind, K. Gibson, K. Wenger, F. Hatzack, L. Nilsson, S. Salmon, S. Pedersen, H. Heldt-Hansen, P. Poulsen, H. Lund, K. Oxenbøll, G. Wu, H. Pedersen and H. Xu** (2007). "Industrial Enzymes." White Biotechnology: 59-131.
- Schmid, F. X.** (1997). "Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes." In Proofs for Protein Structure: A practical approach. Chapter 11, pp 259-295. Creighton T.E., IRL Press, Oxford, 2ed.
- Schmidt, S., S. Sunyaev, P. Bork and T. Dandekar** (2003). "Metabolites: a helping hand for pathway evolution?" Trends Biochem Sci **28**(6): 336-41.
- Schneider, W. P., B. P. Nichols and C. Yanofsky** (1981). "Procedure for producing of hybrid genes and proteins and its use in assessing significance of amino acid differences in homologous tryptophan synthetase alpha polypeptides." Proc Natl Acad Sci U S A **78**: 2169-73.
- Schwander, M.** (1997). "Cloning of the *hisA* gene from the hyperthermophile *Thermotoga maritima*; expression, purification and characterization of 5'-ProFAR isomerase." Diploma thesis, Universität Basel, Schweiz.
- Sears, L. E., L. S. Moran, C. Kissinger, T. Creasey, H. Perry-O'Keefe, M. Roskey, E. Sutherland and B. E. Slatko** (1992). "CircumVent thermal cycle sequencing and alternative manual and automated DNA sequencing protocols using the highly thermostable VentR (exo-) DNA polymerase." Biotechniques **13**(4): 626-33.
- Seelig, B. and J. W. Szostak** (2007). "Selection and evolution of enzymes from a partially randomized non-catalytic scaffold." Nature **448**(7155): 828-31.
- Seitz, T., M. Bocola, J. Claren and R. Sterner** (2007). "Stabilisation of a (betaalpha)8-barrel protein designed from identical half barrels." J Mol Biol **372**(1): 114-29.

- Serrano, L., A. Horovitz, B. Avron, M. Bycroft and A. R. Fersht** (1990). "Estimating the contribution of engineered surface electrostatic interactions to protein stability by using double-mutant cycles." Biochemistry **29**(40): 9343-52.
- Sharp, P. A., B. Sugden and J. Sambrook** (1973). "Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis." Biochemistry **12**(16): 3055-63.
- Shoichet, B. K., W. A. Baase, R. Kuroki and B. W. Matthews** (1995). "A relationship between protein stability and protein function." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(2): 452-6.
- Sieber, V.** (2003). "Selection for soluble proteins via fusion with chloramphenicol acetyltransferase." Methods Mol Biol **230**: 45-55.
- Sieber, V., C. A. Martinez and F. H. Arnold** (2001). "Libraries of hybrid proteins from distantly related sequences." Nat Biotechnol **19**(5): 456-60.
- Slatko, B. E.** (1994). "Thermal cycle dideoxy DNA sequencing." Methods Mol Biol **31**: 35-45.
- Smyth, D. R., M. K. Mrozkiewicz, W. J. McGrath, P. Listwan and B. Kobe** (2003). "Crystal structures of fusion proteins with large-affinity tags." Protein Sci **12**(7): 1313-22.
- Soberon, X., P. Fuentes-Gallego and G. Saab-Rincon** (2004). "In vivo fragment complementation of a (beta/alpha)(8) barrel protein: generation of variability by recombination." FEBS Lett **560**(1-3): 167-72.
- Söding, J. and A. N. Lupas** (2003). "More than the sum of their parts: On the evolution of proteins from peptides." BioEssays **25**(9): 837-846.
- Söding, J., M. Remmert and A. Biegert** (2006). "HHrep: de novo protein repeat detection and the origin of TIM barrels." Nucleic Acids Res **34**(Web Server issue): W137-42.
- Spek, E. J., A. H. Bui, M. Lu and N. R. Kallenbach** (1998). "Surface salt bridges stabilize the GCN4 leucine zipper." Protein Sci **7**(11): 2431-7.
- Spiro, K.** (1900). "Über die Beeinflussung der Eiweisscoagulation durch stickstoffhaltige Substanzen." Z Physiol Chem **30**: 182-199.
- Stark, G. R.** (1965). "Reactions of cyanate with functional groups of proteins. 3. Reactions with amino and carboxyl groups." Biochemistry **4**(6): 1030-6.
- Stemmer, W. P.** (1994). "Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling." Nature **370**(6488): 389-91.
- Sterner, R., A. Dahm, B. Darimont, A. Ivens, W. Liebl and K. Kirschner** (1995). "(Beta alpha)8-barrel proteins of tryptophan biosynthesis in the hyperthermophile Thermotoga maritima." Embo J **14**(18): 4395-402.
- Sterner, R. and B. Hocker** (2005). "Catalytic versatility, stability, and evolution of the (betaalpha)8-barrel enzyme fold." Chem Rev **105**(11): 4038-55.
- Sterner, R., G. R. Kleemann, H. Szadkowski, A. Lustig, M. Hennig and K. Kirschner** (1996). "Phosphoribosyl anthranilate isomerase from Thermotoga maritima is an extremely stable and active homodimer." Protein Sci **5**(10): 2000-8.
- Studier, F. W., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn and J. W. Dubendorff** (1990). "Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes." Methods Enzymol **185**: 60-89.
- Stüber, D., H. Matile and G. Garotta** (1990). "System for high level production in *E. coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies and structure-function analysis." In: I. Lefkovits and B. Bernis, editors. Immunological Methods, 4th ed. Academic Press, New York. 121-215.

- Takano, K., K. Tsuchimori, Y. Yamagata and K. Yutani** (2000). "Contribution of salt bridges near the surface of a protein to the conformational stability." Biochemistry **39**(40): 12375-81.
- Terwilliger, T. C.** (1995). "Engineering the stability and function of gene V protein." Adv Protein Chem **46**: 177-215.
- Thoma, R., M. Schwander, W. Liebl, K. Kirschner and R. Sterner** (1998). "A histidine gene cluster of the hyperthermophile *Thermotoga maritima*: sequence analysis and evolutionary significance." Extremophiles **2**(4): 379-89.
- Toscano, M. D., K. J. Woycechowsky and D. Hilvert** (2007). "Minimalist active-site redesign: teaching old enzymes new tricks." Angew Chem Int Ed Engl **46**(18): 3212-36.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon** (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.
- Tsien, R. Y.** (1998). "The green fluorescent protein." Annu Rev Biochem **67**: 509-44.
- van den Berg, S., P. A. Lofdahl, T. Hard and H. Berglund** (2006). "Improved solubility of TEV protease by directed evolution." J Biotechnol **121**(3): 291-8.
- Vanhercke, T., C. Ampe, L. Tirry and P. Denolf** (2005). "Reducing mutational bias in random protein libraries." Anal Biochem **339**(1): 9-14.
- Veith, D. and M. Veith** (2005). "Biologie fluoreszierender Proteine." Biol. Unserer Zeit **6**(35): 394-404.
- Vetriani, C., D. L. Maeder, N. Tolliday, K. S. Yip, T. J. Stillman, K. L. Britton, D. W. Rice, H. H. Klump and F. T. Robb** (1998). "Protein thermostability above 100 degreesC: a key role for ionic interactions." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12300-5.
- Vogel, C., S. A. Teichmann and J. Pereira-Leal** (2005). "The relationship between domain duplication and recombination." J Mol Biol **346**(1): 355-65.
- Volkov, A. A. and F. H. Arnold** (2000). "Methods for in vitro DNA recombination and random chimeragenesis." Methods Enzymol **328**: 447-56.
- Waldo, G. S., B. M. Standish, J. Berendzen and T. C. Terwilliger** (1999). "Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein." Nat Biotechnol **17**(7): 691-5.
- Wang, W. and B. A. Malcolm** (1999). "Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Directed Mutagenesis." Biotechniques **26**(4): 680-2.
- Wierenga, R. K.** (2001). "The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes." FEBS Lett **492**(3): 193-8.
- Wolf, Y. I., N. V. Grishin and E. V. Koonin** (2000). "Estimating the number of protein folds and families from complete genome data." J Mol Biol **299**(4): 897-905.
- Woycechowsky, K. J., K. Vamvaca and D. Hilvert** (2007). "Novel enzymes through design and evolution." Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol **75**: 241-94, xiii.
- Wright, H., L. Noda-Garcia, A. Ochoa-Leyva, D. A. Hodgson, V. Fulop and F. Barona-Gomez** (2008). "The structure/function relationship of a dual-substrate (betaalpha)8-isomerase." Biochem Biophys Res Commun **365**(1): 16-21.
- Wurth, C., N. K. Guimard and M. H. Hecht** (2002). "Mutations that reduce aggregation of the Alzheimer's Abeta42 peptide: an unbiased search for the sequence determinants of Abeta amyloidogenesis." J Mol Biol **319**(5): 1279-90.

- Xiao, L. and B. Honig** (1999). "Electrostatic contributions to the stability of hyperthermophilic proteins." J Mol Biol **289**(5): 1435-44.
- Yadid, I. and D. S. Tawfik** (2007). "Reconstruction of functional beta-propeller lectins via homo-oligomeric assembly of shorter fragments." J Mol Biol **365**(1): 10-7.
- Yanai, I., Y. I. Wolf and E. V. Koonin** (2002). "Evolution of gene fusions: horizontal transfer versus independent events." Genome Biol **3**(5): research0024.
- Yang, J. K., H. J. Yoon, H. J. Ahn, B. I. Lee, S. H. Cho, G. S. Waldo, M. S. Park and S. W. Suh** (2002). "Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the Rv2002 gene product from *Mycobacterium tuberculosis*, a beta-ketoacyl carrier protein reductase homologue." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **58**(Pt 2): 303-5.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira and J. Messing** (1985). "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors." Gene **33**(1): 103-19.
- Ycas, M.** (1974). "On earlier states of the biochemical system." J Theor Biol **44**(1): 145-60.
- Yokoe, H. and T. Meyer** (1996). "Spatial dynamics of GFP-tagged proteins investigated by local fluorescence enhancement." Nat Biotechnol **14**(10): 1252-6.
- Zhang, C. and C. DeLisi** (1998). "Estimating the number of protein folds." J Mol Biol **284**(5): 1301-5.
- Zhao, H., L. Giver, Z. Shao, J. A. Affholter and F. H. Arnold** (1998). "Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination." Nat Biotechnol **16**(3): 258-61.
- Zheng, L., U. Baumann and J. L. Raymond** (2004). "An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol." Nucleic Acids Res **32**(14): e115.

## 7 Anhang

### 7.1 Ausbeuten von ausgewählten Proteinvarianten

**Tabelle 40: Ausbeuten bei der Reinigung ausgewählter Proteinvarianten.**

Die Expression von HisAF-Varianten erfolgte in LB- oder in TB-Medium (in Klammern angegeben), aus i.d.R. 2 l Kulturvolumen. Die Expression von HisA- bzw. HisF-Varianten erfolgte in LB-Medium aus i.d.R. 1 l Kulturmedium. RF: Reinigung aus der unlöslichen Zellfraktion durch Rückfaltung.

Protein	Ausbeute aus 1 l Kultur [mg]
HisAFwt (LB ; RF)	ca. 60
HisAF-F226E (TB)	45,2
HisAF- <i>Ins</i> .[M+L+A]+M1K+L2R+T45D+L46E+Y140H (TB)	41,4
HisAF-Y140H (LB)	29,0
HisAF-V231M (TB; RF)	32,2
HisAF-Y140H+V231M (LB)	25,0
HisAF-Y140H+F226E (TB)	68,2
HisAF-D8V+Y140H+F226E (TB)	>100
HisAFseII' (LB)	5,5 (LB) / 16,6 (TB)
HisAFseIII' (LB)	1,9 (LB) / 18,6 (TB)
HisAFseIII' (LB)	16,1
HisAFseIV' (LB)	17,2
HisAF-Y140H+D127V (LB)	15,9
HisAF-Y140H+V231M+D127V (LB)	16,7
HisAF-Y140H+D8N+D127V (LB)	20,4
HisAFcomI (TB)	45,6
HisAFcomII (TB)	38,9
HisAFcomIII (TB)	19,6
HisAFcomIII+H48L (TB)	2,1
HisAFcomIII +V3I+I126M (TB)	18,4
HisAFcomIII +L2H+K144N (TB)	11,3
HisAFcomIII +L2H+F10Y+D86N+V157A (TB)	35,6
HisAFcomIII +A15V+V65I+L85P (TB)	9,2
HisAFcomIII +D108E+F138L (TB)	6,8
HisAFcomIII +L2H+V3I+F10Y+K144N (TB)	26,8
HisAFcomIII / F111S (TB)	17,5
HisAFcomII-loop5 #1 (TB)	19,5
HisAFcomII-loop5 #3 (TB)	13,1
HisAFcomII-loop5 #5 (TB)	20,4
HisAFcomII-loop5 #5' (TB)	25,6
HisAFcomII-loop5 #7 (TB)	20,9
HisAFcomII-loop5 #11 (TB)	8,6
HisAFcomII-loop5 #17 (TB)	9,6
HisA-H75Y+F111S+D127V	84,3
HisA-H75Y+F111S+D127V+D169V	63,0
HisF-D130V+Y143H+K143E+T146M+ D176V	119,1

## 7.2 Refraktometrische Bestimmung der Harnstoffkonzentration

Die Konzentration von Harnstoff in der Stammlösung wurde über den Brechungsindex bestimmt. Dazu wurde der Puffer ohne Harnstoff als Referenz verwendet. Bezeichnet man die Differenz der Brechungsindizes der Harnstoff- und der Referenzlösung als  $\Delta n$ , so berechnet sich die Konzentration nach folgender Formel (John R. Warren, 1966):

$$c [M] = 117,66 \cdot \Delta n + 29,753(\Delta n)^2 + 185,56(\Delta n)^3$$

## 7.3 Expression und Reinigung der Hilfsenzyme yPRT und tmTrpC

Zur Messung der TrpF-Aktivität werden die beiden Hilfsenzyme Anthranilat-Phosphoribosyltransferase aus der Hefe (yPRT) und Indolglycerolphosphatsynthase aus *Thermotoga maritima* (tmTrpC) benötigt. Das labile TrpF-Substrat PRA wird *in situ* durch yPRT aus Anthranilsäure und PRPP erzeugt bzw. regeneriert (Hommel *et al.*, 1995). Zur Vermeidung von Produktinhibition setzt man tmTrpC zu, welches die Umwandlung des Produkts der TrpF-Reaktion, CdRP, zu IGP katalysiert. Das Gen für yPRT lag in der Arbeitsgruppe in pET28a kloniert vor. Durch die Verwendung von pET28a wird N-terminal an yPRT ein (His)<sub>6</sub>-Tag angefügt, der für die Aufreinigung mittels Nickel-Chelat-Affinitätschromatografie verwendet werden kann. Das Gen *tmtrpC* lag in pET21a kloniert vor. Hier wird C-terminal ein (His)<sub>6</sub>-Tag angefügt, wodurch ebenfalls eine Reinigung mittels Nickel-Chelat-Affinitätschromatografie durchgeführt werden kann.

Zur Expression und Reinigung der beiden Hilfsenzyme wurden *E. coli* T7 Express Rosetta Zellen mit den jeweiligen Plasmiden transformiert und auf entsprechendem LB-Selektionsmedium ausplattiert. Es wurden jeweils zwei einzelne Kolonien für eine Expression im analytischen Maßstab in 5 ml LB-Selektionsmedium angezogen. Beide Enzyme fanden sich nach Induktion mit 0,5 mM IPTG überwiegend in der löslichen Fraktion des Zellextraktes.

Es wurde jeweils derjenige Klon, der zur höchsten Proteinausbeute führte, für eine Expression im präparativen Maßstab verwendet. Diese erfolgte in jeweils vier Liter TB-Medium über Nacht. Für tmTrpC lag die Expressionstemperatur bei 37 °C, für yPRT bei 25 °C. Die Expression beider Proteine wurde jeweils mit 0,5 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden in 10 mM KP, pH 7,5 resuspendiert und anschließend



aufgeschlossen. In einem ersten Reinigungsschritt konnte tmTrpC durch Hitzebehandlung des Zellextraktes (15 min, 75 °C) effizient angereichert werden. Für das thermolabile yPRT war dieser Anreicherungsschritt nicht möglich.

Sowohl für yPRT als auch für tmTrpC wurden abweichend von anderen Nickel-Chelat-Affinitäts-Reinigungen (3.4.2.2) folgende Puffer für die Reinigungen gewählt:

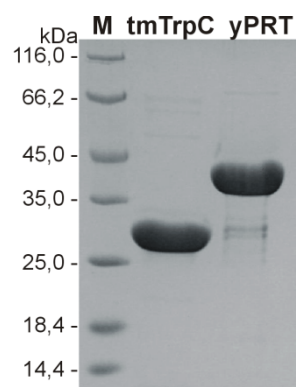
**Laufpuffer:** 50 mM Tris/HCl, pH 7,8, 500 mM NaCl, 15 mM Imidazol

**Elutionspuffer:** 50 mM Tris/HCl, pH 7,8, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol

Es wurde Tris/HCl-Puffer anstelle von Kaliumphosphatpuffer verwendet, da beobachtet wurde, dass Orthophosphat die TrpF-Reaktion kompetitiv inhibiert.

Beide Proteine eluierten bei einer Imidazolkonzentration von 60 bis 240 mM. Saubere Fraktionen von yPRT und tmTrpC wurden vereinigt, das Imidazol durch Dialyse gegen jeweils zweimal 5 l 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 entfernt, anschließend in flüssigen Stickstoff eingetropft und bei -80 °C gelagert.

Die Konzentrationen von yPRT und tmTrpC wurden über die Messung der Absorption bei 280 nm unter Verwendung des aus der Aminosäuresequenz berechneten molaren Extinktionskoeffizienten (Pace *et al.*, 1995) bestimmt. Aus 4 l TB-Medium konnten ca. 97 mg sauberes tmTrpC gewonnen werden. Nach Auftrag des löslichen Überstandes auf eine 5 ml HisTrap Crude Säule konnten ca. 217 mg (zwei Reinigungsläufe) sauberes yPRT gereinigt werden. Abbildung 81 zeigt das Ergebnis der Reinigung über Nickel-Chelat-Affinitätschromatografie der beiden Hilfsenzyme tmTrpC und yPRT.



**Abbildung 81: Ergebnis der Aufreinigung der Hilfsenzyme tmTrpC und yPRT, verfolgt über SDS-PAGE (12,5 % Polyacrylamid).**

Aufgetragen wurden je 5 µl eines mit SDS-Probenpuffer versetzten Aliquots eines Pools der saubersten Elutionsfraktionen der Nickel-Chelat-Affinitätschromatografie. M: Markerproteine mit molekularer Masse in kDa.

## 7.4 Proteinsequenzen der verwendeten Konstrukte

### HisA aus *T. maritima* (pdb: 1qo2)

```

1 - MLVVPAIDLF RGKVARMIKG RKENTIFYEK DPVELVEKLI EEGFTLIHVV DLSNAIENSG
61 - ENLPVLEKLS EFAEHIQIGG GIRSLDYAEK LRKLGYRRQI VSSKVLEDPS FLKSLREIDV
121 - EPVFSLDTRG GRVAFKGWLA EEEIDPVSLI KRLKEYGLEE IVHTEIEKDG TLQEHDFSLT
181 - KKIAIEAEVK VLAAGGISSE NSLKTAQKVH TETNGLLKGV IVGRAFLEGI LTVEVMKRYA
241 - R

```

### HisF aus *T. maritima* (pdb: 1thf)

```

1 - MLAKRIIACL DVKDGRVVKG TNFENLRDSG DPVELGKFYS EIGIDELVFL DITASVEKRR
61 - TMLELVEKVA EQIDIPFTVG GGIHDFETAS ELILRGADKV SINTAAVENP SLITQIAQTF
121 - GSQAVVVAID AKRVDGEFMV FTYSKGKNTG ILLRDWVVEV EKRGAIGEILL TSIDRDGTSK
181 - GYDTEMIRFV RPLTTLPIIA SGGAGKMEHF LEAFLAGADA ALAASVFHFR EIDVRELKEY
241 - LKKHGVNVRL EGL

```

### HisAF (HisA: 1–119 (rot); HisF: 123–253 (blau))

```

1 - MLVVPAIDLF RGKVARMIKG RKENTIFYEK DPVELVEKLI EEGFTLIHVV DLSNAIENSG
61 - ENLPVLEKLS EFAEHIQIGG GIRSLDYAEK LRKLGYRRQI VSSKVLEDPS FLKSLREIDQ
121 - AVVVAIDAKR VDGEFMVFTY SGKKNTGILL RDWVVEVEKR GAGEILLTSI DRDGTSGGYD
181 - TEMIRFVRPL TTLPIIASGG AGKMEHFLEA FLAGADAALA ASVFHFREID VRELKEYLKK
241 - HGVNVRLEGL

```

### HisFA (HisF: 1–122 (blau); HisA: 120–241 (rot))

```

1 - MLAKRIIACL DVKDGRVVKG TNFENLRDSG DPVELGKFYS EIGIDELVFL DITASVEKRR
61 - TMLELVEKVA EQIDIPFTVG GGIHDFETAS ELILRGADKV SINTAAVENP SLITQIAQTF
121 - GSVEPVFSLD TRGGRVAFKG WLAEEDIDPV SLLKRLKEYG LEEIVHTEIE KDGTLEHDF
181 - SLTKKIAIEA EVKVLAAAGI SSENSLKTAQ KVHTETNGLL KGVIVGRAFL EGILTVEVMK
241 - RYAR

```

## 7.5 DNA-Sequenzen der verwendeten Konstrukte

### HisA:

```

1  ATGCTCGTTG  TCCCGGCGAT  AGATCTCTTC  AGAGGAAAGG  TAGCGAGGAT
51  GATAAAAGGA  AGAAAAGAGA  ACACCATATT  TTACGAAAAA  GATCCCGTAG
101 AACTGGTGGA  AAAACTCATC  GAAGAGGGAT  TCACACTGAT  TCACGTGGTG
151 GATCTCTCGA  ATGCGATAGA  AAACAGCGGC  GAGAATCTTC  CAGTTCTCGA
201 GAAACTCTCT  GAATTTGCCG  AGCACATACA  GATCGGAGGC  GGGATCAGAT
251 CGCTCGATTA  CGCGGAAAAA  CTCCGAAAGC  TGGGATACAG  AAGACAGATC
301 GTGAGCTCAA  AGGTTCTGGA  AGATCCTTCT  TTCCTGAAAT  CCCTGAGAGA
351 AATCGATGTG  GAGCCCGTGT  TCAGTCTGGA  CACTCGAGGT  GGAAGAGTAG
401 CGTTCAAAGG  GTGGCTGGCG  GAAGAGGAGA  TCGACCCTGT  TTCTCTTCTG
451 AAGAGACTGA  AAGAATACGG  CCTTGAAGAG  ATCGTACACA  CGGAGATCGA
501 AAAAGATGGC  ACTCTTCAGG  AGCACGATTT  TTCTCTCACC  AAAAAGATAG
551 CGATCGAAGC  TGAAGTGAAA  GTACTCGCAG  CGGGTGGTAT  CTCTTCGGAG
601 AACTCTTTGA  AAACAGCGCA  GAAGGTTTAC  ACAGAAACGA  ACGGGCTTCT
651 CAAAGGTGTG  ATCGTGGAAG  GGGCGTTTCT  GGAGGGAATT  CTCACAGTTG
701 AGGTGATGAA  GAGATATGCT  CGCTAA

```

### HisF:

```

1  ATGCTCGCTA  AAAGAATAAT  CGCGTGTCTC  GATGTGAAAG  ACGGTCGTGT
51  GGTGAAGGGA  ACGAACTTCG  AAAACCTCAG  GGACAGCGGT  GATCCTGTCTG
101 AACTGGGAAA  GTTCTATTCC  GAAATTGGAA  TAGACGAACT  CGTTTTTCTG
151 GATATCACCG  CGTCCGTTGA  GAAGAGGAAA  ACCATGCTGG  AACTGGTCGA
201 AAAGGTGGCC  GAGCAGATCG  ACATTCCGTT  CACTGTTGGA  GGAGGTATCC
251 ACGACTTCGA  AACGGCCTCG  GAGCTCATTC  TCCGTGGTGC  GGACAAGGTG
301 AGCATAAACA  CGGCGGCTGT  GGAGAATCCT  TCTTTGATCA  CACAGATCGC
351 TCAAACTTTT  GGGAGTCAGG  CCGTTGTCTG  GGCGATAGAT  GCAAAAAGAG
401 TGGATGGAGA  GTTCATGGTC  TTCACCTACT  CCGGAAAGAA  GAACACGGGC
451 ATACTTCTGA  GAGACTGGGT  GGTGAAGTA  GAAAAGAGAG  GAGCAGGAGA
501 GATCCTGCTC  ACCAGTATCG  ACAGAGACGG  CACAAAATCG  GGTTACGATA
551 CGGAGATGAT  AAGGTTTCGT  AGGCCACTAA  CCACACTTCC  CATCATCGCT
601 TCCGGTGGTG  CGGGAAAAAT  GGAACATTTT  CTTGAAGCCT  TCCTGGCAGG
651 TGCCGACGCT  GCCCTTGCGG  CTTCTGTCTT  TCACTTCAGA  GAGATCGACG
701 TGAGAGAACT  GAAAGAGTAC  CTCAAAAAAC  ACGGAGTGAA  CGTGAGACTG
751 GAGGGGTTGT  GA

```

**HisAF**

```

01 ATGCTCGTTG TCCCGGCGAT AGATCTCTTC AGAGGAAAGG TAGCGAGGAT
51 GATAAAAGGA AGAAAAGAGA ACACCATATT TTACGAAAAA GATCCCGTAG
101 AACTGGTGGA AAAACTCATC GAAGAGGGAT TCACACTGAT TCACGTGGTG
151 GATCTCTCGA ATGCGATAGA AACAGCGGC GAGAATCTTC CAGTTCTCGA
201 GAAACTCTCT GAATTTGCCG AGCACATACA GATCGGAGGC GGGATCAGAT
251 CGCTCGATTA CGCGGAAAAA CTCCGAAAGC TGGGATACAG AAGACAGATC
301 GTGAGCTCAA AGGTTCTGGA AGATCCTTCT TTCCTGAAAT CCCTGAGAGA
351 AATCGATCAG GCCGTTGTCTG TGGCGATAGA TGCAAAAAGA GTGGATGGAG
401 AGTTCATGGT CTTACCTAC TCCGGAAGA AGAACACGGG CATACTTCTG
451 AGAGACTGGG TGGTTGAAGT AGAAAAGAGA GGAGCAGGAG AGATCCTGCT
501 CACCAAGTATC GACAGAGACG GCACAAAATC GGGTTACGAT ACGGAGATGA
551 TAAGGTTTCGT GAGGCCACTA ACCACACTTC CCATCATCGC TTCCGGTGGT
601 GCGGGAAAAA TGGAACATTT CCTTGAAGCC TTCCTGGCAG GTGCCGACGC
651 TGCCCTTGCG GCTTCTGTCT TTCACTTCAG AGAGATCGAC GTGAGAGAAC
701 TGAAAGAGTA CCTCAAAAAA CACGGAGTGA ACGTGAGACT GGAGGGGTTG
751 TGA

```

**HisFA**

```

01 ATGCTCGCTA AAAGAATAAT CGCGTGTCTC GATGTGAAAG ACGGTCGTGT
51 GGTGAAGGGA ACGAACTTCG AAAACCTCAG GGACAGCGGT GATCCTGTCTG
101 AACTGGGAAA GTTCTATTCC GAAATTGGAA TAGACGAACT CGTTTTTCTG
151 GATATCACCG CGTCCGTTGA GAAGAGGAAA ACCATGCTGG AACTGGTCTGA
201 AAAGGTGGCC GAGCAGATCG ACATTCCGTT CACTGTTGGA GGAGGTATCC
251 ACGACTTCGA AACGGCCTCG GAGCTCATTC TCCGTGGTGC GGACAAGGTG
301 AGCATAAACA CGGCGGCTGT GGAGAATCCT TCTTTGATCA CACAGATCGC
351 TCAAACCTTT GGGAGTGTGG AGCCCGTGTT CAGTCTGGAC ACTCGAGGTG
401 GAAGAGTAGC GTTCAAAGGG TGGCTGGCGG AAGAGGAGAT CGACCCTGTT
451 TCTCTTCTGA AGAGACTGAA AGAATACGGC CTTGAAGAGA TCGTACACAC
501 GGAGATCGAA AAAGATGGCA CTCTTCAGGA GCACGATTTT TCTCTCACCA
551 AAAAGATAGC GATCGAAGCT GAAGTGAAAG TACTCGCAGC GGGTGGTATC
601 TCTTCGGAGA ACTCTTTGAA AACAGCGCAG AAGGTTTACA CAGAAACGAA
651 CGGGCTTCTC AAAGGTGTGA TCGTGGAAG GCGTTTTCTG GAGGGAATTC
701 TCACAGTTGA GGTGATGAAG AGATATGCTC GCTAA

```

## 7.6 Kurzprotokoll zur Herstellung von Genbanken

In diesem Protokoll werden kritische Schritte, die die Größe einer Genbank beeinflussen, fett hervorgehoben. Für detaillierte Informationen wird auf das jeweilige Kapitel dieser Arbeit verwiesen.

- Zur **Vermeidung von Kontaminationen** der Genbank mit *E. coli* eigenen Genen: Der Vektor, in den die Genbank kloniert wird und der Vektor mit dem Gen, das randomisiert werden soll, sollte jeweils aus dem Deletionsstamm, der später zur Selektion verwendet wird, präpariert werden.

### Tag 1

- **200 ml SOB-Medium** herstellen für die Anzucht kompetenter *E. coli* Zellen (In früheren Arbeiten erfolgte die Anzucht aus 500 ml LB- oder SOB-Medium. In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass die Kompetenz der Zellen höher ist, wenn diese aus einem geringeren Anzuchtvolumen präpariert wurden.)
- 100 ml SOB-Medium herstellen (für SOC). Die Zellen werden nach der Elektrottransformation mit 3× 500 µl **SOC-Medium** aus der Küvette gespült.
- 3× 1 l SOB-Medium mit Agar herstellen (**für SOC-Agar**). Davon können 40 große (Ø 14,5 cm) und 20 kleine (Ø 8,5 cm) Agarplatten hergestellt werden.
- 500 ml MILLIPORE-Wasser autoklavieren und anschließend kalt stellen (4 °C; Zur Herstellung der kompetenten Zellen).
- 300 ml MILLIPORE-Wasser autoklavieren, bei RT lagern (zur Dialyse der Ligationsansätze).
- epPCR ansetzen (3 Ansätze à 50 µl; 3.3.7.4)
  - o epPCRs mittels präparativer Gelelektrophorese und anschließender Gelextraktion aufreinigen (3.3.1); vor Elution mit 40 µl H<sub>2</sub>O (**50 °C**) Säulchen mit gebundener DNA für 1 min bei **50 °C inkubieren** (restliches Ethanol wird verdampft).
- präparative Spaltung mit Restriktionsenzymen (3.3.4.1) von 2 µg Vektor und epPCR-Produkt (3 Ansätze) in jeweils 50 µl Gesamtvolumen (Dauer: 4 h oder üN, abhängig von den Restriktionsenzymen, 37 °C).
  - o Verdaue mittels präparativer Gelelektrophorese und anschließender Gelextraktion aufreinigen; vor Elution mit 30 µl H<sub>2</sub>O (50 °C) Säulchen mit gebundener DNA für 1 min bei 50 °C inkubieren
- Ligationen (3.3.4.2) ansetzen (6-9 Ansätze à 20 µl; i.d.R. 2 µl Vektor + 6 µl Insert) mit 1 U T4-DNA-Ligase (**Roche**) bei 16 °C üN.
- 50 ml Vorkultur mit dem *E. coli* Deletionsstamm animpfen (siehe oben), der zur Selektion verwendet wird (wenn dieser Stamm eine hohe Transformationseffizienz zeigt; ansonsten einen Klonierungsstamm – z. B. *E. coli* XL1 Blue MRF' oder *E. coli* Turbo verwenden).

### Tag 2

- 200 ml SOB mit *E. coli* Zellen auf OD<sub>600</sub> = 0,1 animpfen, bei OD<sub>600</sub> = 0,6 ernten und kompetente Zellen zur Elektrottransformation herstellen (3.2.4);

am Ende Zellen in dem für die Anzahl der Transformationen benötigten Volumen H<sub>2</sub>O aufnehmen (z. B. 2 ml, wenn 20 Transformationen durchgeführt werden sollen mit Zellaliquots à 100 µl).

- Dialyse der Ligationsansätze (3.2.5).
- Transformation der *E. coli* Zellen mit den Ligationsansätzen (3.3.8; pro 100 µl Zellen 6 µl Ligationsansatz zugeben).
- Zur Bestimmung der Transformationseffizienz 100 µl Zellen mit 100 ng des „leeren“ Vektors transformieren.
- Nach der Kur für 1 h bei 37 °C: Zellen bei 4000 rpm, 10 min, **25 °C** (EPPENDORF CENTRIFUGE 5810R) abzentrifugieren, anschließend in 8 ml **SOC-Medium** resuspendieren.
- 200 µl der Zellen pro große Petrischale (Ø14,5 cm; **SOC-Agar**; insgesamt 40 Stück) ausplattieren.
- Außerdem: Genbank & Kontrolltransformation zur Bestimmung der Transformationseffizienz in folgenden Verdünnungen auf kleinen SOC-Agarplatten (Ø 8,5 cm) ausstreichen: 1:10 – 1:100 – 1:10.000 – 1:100.000 – 1:1.000.000 – 1:10.000.000; Inkubation üN, 37 °C.

### Tag 3

- Transformationseffizienz der Zellen bestimmen (3.2.7).
- Bestimmung der Größe der Genbank (3.3.8.1).
- Zellen von großen Petrischalen mit sterilem Spatel und LB-Medium abschaben und in 50 ml Falcons sammeln (3.3.8).
- Präparative DNA-Extraktion mittels Maxi-Präparation (3.3.1.2; eine Maxipräparation für etwa 5 g Zellen).

## 8 Danksagung

---

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Reinhard Sterner herzlich bedanken. Bei der Bearbeitung des spannenden und zugleich vielseitigen Themas konnte ich stets auf seinen guten Rat, sein großes Interesse und auf wissenschaftliche Freiheiten vertrauen. Insbesondere möchte ich mich trotz anfänglicher Durststrecke zu Beginn des Projekts für das stetige Vertrauen in meine Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Gernot Längst danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Birte Höcker vom MPI für Entwicklungsbiologie in Tübingen. Sie ist in den letzten Jahren eine wertvolle wissenschaftliche Begleiterin geworden, der ich bedeutende Anregungen für dieses Projekt und wichtige Kristallstrukturen zu verdanken habe.

Bedanken möchte ich mich bei allen, die mich unterstützt haben, erfolgreich *E. coli* Zellen am FACS zu sortieren. Dazu gehören Wolfgang Forster (Arbeitsgruppe Prof. Thomm), Dr. Stefan Becker (Arbeitsgruppe Prof. Kolmar, TU Darmstadt) und Dr. Peter Hauptmann (Arbeitsgruppe Prof. Lehle).

Besonders herzlich möchte ich mich bei Christiane Endres bedanken. Ihre zuverlässige Hilfe und unermüdlicher Einsatz waren für das Gelingen des Projekts sehr wertvoll. Zusätzlich möchte ich mich an dieser Stelle bei den guten Seelen des Labors bedanken. Christiane Endres, Sonja Fuchs, Barbara Kellerer, Claudia Pauer, Hermine Reisner und Jeannette Ueckert sorgen dafür, dass der Laden läuft und halten stets eine helfende Hand bereit.

Besonders bedanken möchte ich mich außerdem bei Felix List und Tobias Seitz. Beiden habe ich viele schöne und witzige Momente innerhalb und außerhalb der Uni zu verdanken. Als Diskussionspartner waren beide sehr wertvoll und die Zusammenarbeit war perfekt.

Ein ganz großes Dankeschön geht an die Arbeitsgruppe Sterner. Als letzter Kölner habe ich mich stets sehr wohl bei Euch gefühlt. Dr. Patrick Babinger und Dr. Sandra Schlee haben es mit ihrer ruhigen und kompetenten Art immer wieder geschafft, mich zu begeistern. Die Zusammenarbeit mit dem für mich bayerischsten Kollegen Alexander Ehrmann hat viel Spaß gemacht und war aufgrund der vielen Impulse sehr hilfreich für mich. Markus Richter hat es durch verschiedenste Aktionen immer wieder geschafft, für die nötige Ablenkung innerhalb und außerhalb des Labors zu sorgen. Zu einer stets angenehmen und hilfsbereiten Arbeitsatmosphäre haben Susanne Dietrich, Harald Guldán, Daniel Schneider und Thomas Schwab beigetragen. Dr. André Fischer hat durch zahlreiche Ideen angeregt, Probleme auch noch mal aus einem anderen Blickwinkel zu sehen. Für ein immer offenes Ohr möchte ich mich bei Dr. Marco Bocola und Klaus-Jürgen Tiefenbach bedanken. Zur guten Atmosphäre haben auch Claudia Seidl und Hermann Zellner beigetragen.

Dr. Helmut Durchschlag und Dr. Rainer Merkl danke ich für zahlreiche wissenschaftliche und semi-wissenschaftliche Gespräche, die oft interessant und gleichermaßen erheiternd waren.

Ein liebes Dankeschön auch an Sabine Einhell und Adriane Lochner, die durch ihre erfrischende Art unseren Schreibraum deutlich bereichert haben. Bei unserem „Außenposten in der Türkei“ Serap Evran möchte ich mich für die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit bedanken. Es war immer schön, wenn Du da warst.

Bei den „Ex-Sternern“ Manal Bosnali und Dr. Michaela Häger möchte ich mich für eine schöne Zeit innerhalb und außerhalb des Labors bedanken, die leider viel zu kurz war. Sehr gerne hätte ich noch viel länger mit Euch zusammengearbeitet.

Besonders herzlich möchte ich mich bei den „fünf Freunden“ bedanken. Insbesondere während der Zeit in Regensburg seid ihr besonders wertvoll für mich geworden. Für die vielen schönen Stunden und „de superjeile Zick“ in Köln, Bedburg und Regensburg ein ganz großes Dankeschön.

Für die Horizonterweiterungen bin ich Dr. Christoph Rohde sehr dankbar. Vom ersten Tag unseres Studiums sind wir einen langen Weg in Verbundenheit gemeinsam gegangen.

Sehr dankbar bin ich ebenfalls Larissa Spiegelberg für den Beitrag, den sie an dieser Arbeit hat.

Ein besonderer Dank gilt Michael Eschweiler und Christoph Eisenbarth. Beide sind sehr wichtig für mich und haben ihren Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei all denjenigen ganz herzlich bedanken, die den Weg nach Regensburg gefunden haben und mir so gezeigt haben, dass sie mich auch fern der Heimat nicht vergessen.

Bei meinen Vermietern Waltraud und Hans Schlag bedanke ich mich sehr herzlich für eine wunderschöne Zeit in der Rauberstraße.

Ganz herzlich danke ich meinen Eltern für ihre ständige Unterstützung, Ihre Teilnahme in guten, aber besonders auch in schwierigen Zeiten und Ihr Interesse an meiner Arbeit. Ihr seid eine konstante Größe, auf die ich mich stets verlassen konnte. Ihr habt mir auch die rheinische Mentalität mit auf den Weg gegeben „et es wie et es“, „et kütt wie et kütt“ und „et hat noch immer jot jejange“. Das hat mir in vielen Situationen sehr geholfen.

Ein ganz herzliches Dankeschön richte ich an Moni, die im letzten Jahr meiner Arbeit meine Kenntnisse des Regensburger Umlands deutlich erweitert hat, für ihre Geduld, die ich ihr abverlangt habe und ihre liebevollen Aufmunterungen.



## 9 Erklärung

---

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken in Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Fall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. R. Sterner betreut worden.

Regensburg, 10. November 2008

---

Jörg Claren

### Teilpublikationen

**Leopoldseder S., Claren J., Jürgens C., Sterner R.,** 2004. Interconverting the catalytic activities of  $(\beta\alpha)_8$ -barrel enzymes from different metabolic pathways: sequence requirements and molecular analysis. *J Mol Biol*, 337: 871-9.

**Höcker B., Claren J., Sterner R.,** 2004. Mimicking enzyme evolution by generating new  $(\beta\alpha)_8$ -barrels from  $(\beta\alpha)_4$ -half-barrels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 16448-53.

**Seitz T., Bocola M., Claren J., Sterner R.,** 2007. Stabilisation of a  $(\beta\alpha)_8$ -barrel protein designed from identical half barrels. *J Mol Biol*, 372: 114-29.

### Tagungsbeitrag

**Claren\* J., Seitz\* T., Höcker B., Sterner R.,** 2006. Evolution and design of  $(\beta\alpha)_8$ -barrels from  $(\beta\alpha)_4$ -half-barrels. *Faltertage; Halle, Leipzig* (Posterbeitrag)

\* Both authors contributed equally to this work.

## 10 Lebenslauf

---

Jörg Claren, geboren am 14.03.1978 in Bedburg, Nordrhein-Westfalen

*Staatsangehörigkeit* deutsch

*Familienstand* ledig

### *Schulausbildung*

1984–1988 Anton-Heinen-Grundschule Kirdorf, Bedburg

1988–1997 Städtisches Gymnasium Bedburg

06/1997 Allgemeine Hochschulreife

### *Hochschulausbildung*

1997-2003 Diplomstudiengang Biologie an der Universität zu Köln

09/2002 Diplomprüfungen in Biochemie (Hauptfach), Genetik und Pharmakologie

10/2002–09/2003 Diplomarbeit bei Prof. Dr. R. Sterner am Institut für Biochemie, Universität zu Köln. Thema der Arbeit: Etablierung einer neuen katalytischen Aktivität im  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* Enzym Imidazolglycerinphosphat-Synthase (HisF) durch Proteindesign

09/2003 Diplom in Biologie

10/2003–05/2004 Wissenschaftlicher Angestellter bei Prof. Dr. R. Sterner am Institut für Biochemie, Universität zu Köln

11/2004–06/2008 Experimentelle Arbeiten zur vorliegenden Dissertation bei Prof. Dr. R. Sterner am Institut für Biophysik und physikalische Biochemie, Universität Regensburg